JORGE LUIS CHACÓN VILLANUEVA

**Epidemiologia molecular do vírus da laringotraqueíte infecciosa
isolados de surtos em poedeiras comerciais no
Estado de São Paulo**

São Paulo

2008

JORGE LUIS CHACÓN VILLANUEVA

**Epidemiologia molecular do vírus da laringotraqueíte infecciosa
isolados de surtos em poedeiras comerciais no
Estado de São Paulo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira

São Paulo

2008

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2080
FMVZ

Chacón Villanueva, Jorge Luis

Epidemiologia molecular do vírus da laringotraqueíte infecciosa isolados de surtos em poedeiras comerciais no Estado de São Paulo / Jorge Luis Chacón Villanueva. – São Paulo : J. L. Chacón Villanueva, 2008.
110 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira.

1. Laringotraqueíte infecciosa. 2. Caracterização molecular. 3. PCR-RFLP. 4. Análise de seqüências. 5. Cepas vacinais e de campo. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Epidemiologia molecular do vírus da laringotraqueíte infecciosa isolados de surtos em poedeiras comerciais no Estado de São Paulo", protocolado sob o nº1155/2007, utilizando 500 (quinhentas) aves (peças de matadouro), sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 19/09/07.

We certify that the Research "Molecular epidemiology of infectious Laringotracheitis virus isolated from outbreak in commercial layer flocks in São Paulo State", protocol number 1155/2007, utilizing 500 (five hundred) flocks, under the responsibility Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 09/19/07.

São Paulo, 20 de setembro de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CHACÓN VILLANUEVA, Jorge Luis

Título: Epidemiologia molecular do vírus da laringotraqueíte infecciosa isolados de surtos em poedeiras comerciais no Estado de São Paulo

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: __/__/__

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

A Deus, à Virgem Maria e Jesus

Pela vida e permanente suporte espiritual,
Por terem colocado no meu caminho pessoas hermosas,
Pela linda família que tenho e estou formando,
Por estarem sempre do meu lado...

A Jorge e Vilma

Meus magníficos e idolatrados pais...
Pelo incalculável amor, apoio e compreensão.
Por serem fonte de inspiração.
Obrigado por tudo...

A Juan José e Ruy

Pelo carinho incondicional e eterno,
Por estar ao meu lado mesmo estando longe,
Por permitirem ser seu amigo...

A Pilar

Pela ilimitada compreensão,
Pela companhia e apoio nos momentos difíceis,
Por ser a companheira ideal,
Pelo seu grande amor como esposa e mãe...

Ao Mathias

Por desbordar meu coração de tanta alegria,
Por demonstrar-me que o amor não tem limite,
Por fornecer-me as forças necessárias para alcançar todos os objetivos...

Ao Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ-USP

Por ter sido por cinco anos minha casa no Brasil,
Por permitirme realizar muitas e valiosas pesquisas,
Por ter sido testemunha de momentos felizes...

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira pela acolhida no Laboratório de Ornitopatologia, pela confiança depositada, o apoio e valiosas sugestões nas pesquisas realizadas e pela orientação no presente trabalho.

À Dra. Claudete pela amizade, pelo constante apoio e a grata convivência.

Aos meus inesquecíveis amigos e colegas do Laboratório de Ornitopatologia: Antonio Carlos, Lidiane, Luciana, Liliana, Marcos Ivo, Camila, Joelma, Mario Sergio, Andyara, Amarilis e André pela valiosa ajuda e belos momentos compartilhados dentro e fora no nosso laboratório.

Ao senhor Mauricio Faria, pela sua valiosa colaboração e amizade.

A Juliana Rodrigues e Micaela pela ajuda prestada.

Aos docentes da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Faculdade de Saúde Pública e do Instituto de Ciências Biológicas da USP que contribuíram no meu crescimento acadêmico e profissional.

Às secretárias da Pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP pelo valioso apoio.

À Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo pelo envio das amostras de campo e vacinais e pela confiança depositada neste trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente cooperaram na realização deste trabalho.

Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 05/56165-1).

RESUMO

CHACÓN VILLANUEVA, J. L. **Epidemiologia molecular do vírus da laringotraqueíte infecciosa isolados de surtos em poedeiras comerciais no Estado de São Paulo.** [Molecular epidemiology of Infectious laryngotracheitis virus isolated from an outbreak in commercial layer flocks in São Paulo State]. 2008. 110 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Este estudo teve como objetivo detectar e caracterizar molecularmente isolados de campo do vírus da laringotraqueíte infecciosa (VLTi) detectados de aves comerciais com e sem sintomatologia da doença de diferentes regiões do Estado de São Paulo. O estudo incluiu amostras coletadas durante e após o primeiro surto epidêmico da laringotraqueíte infecciosa (LTI) no Brasil, região de Bastos, e de outras localidades durante o período de 2002-2008. A caracterização molecular foi realizada através da técnica de polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) de produtos da reação em cadeia pela polimerase (PCR) dos genes da glicoproteína E, G, proteína quinase (TK) e da proteína reguladora da transcrição (ICP4), assim como pela análise de seqüências dos genes TK e ICP4. Para seqüenciamento do gene ICP4 foram desenvolvidas duas reações de PCR que amplificam dois diferentes fragmentos do gene ICP4. As técnicas de PCR-RFLP e seqüenciamento de DNA mostraram resultados idênticos, diferenciando os isolados de campo das cepas vacinais de origem de cultivo celular (TCO) e de embrião de galinha (CEO). Os resultados mostraram que o surto clínico na região de Bastos foi causado por uma cepa não vacinal e de alta virulência (cepa Bastos), embora também tenha sido possível detectar dois isolados relacionados à cepa CEO circulando durante o surto. Verificou-se que a cepa causadora do surto severo na região de Bastos continua circulando na região apesar do uso de vacinas atenuadas. Além disso, foram isoladas amostras relacionadas às cepas CEO e à cepa Bastos a partir de granjas comerciais de poedeiras localizadas fora da região de Bastos e que estão envolvidas em

quadros clínicos da doença. Este estudo mostra (1): a persistência do vírus selvagem de campo na região de Bastos (cepa Bastos) apesar das medidas de controle e do uso de vacinas atenuadas, (2): a disseminação da cepa Bastos e das cepas vacinais CEO para outras regiões, e (3): a eficácia da estratégia padronizada neste estudo para a caracterização e diferenciação de isolados de campo e de cepas vacinais.

Palavras-chave: Laringotraqueíte infecciosa. Caracterização molecular. PCR-RFLP. Análise de seqüências. Cepas vacinais e de campo.

ABSTRACT

CHACÓN VILLANUEVA, J. L. **Molecular epidemiology of Infectious laryngotracheitis virus isolated from an outbreak in commercial layer flocks in São Paulo State.** [Epidemiologia molecular do vírus da laringotraqueíte infecciosa isolados de surtos em poedeiras comerciais no Estado de São Paulo]. 2008. 110 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The objective of this study was the molecular detection and characterization of field isolates of infectious laryngotracheitis virus (ILTV) detected from commercial chickens with and without clinical signs of the disease from regions of the São Paulo state. The study included samples collected during and after of the first epidemic infectious laryngotracheitis (ILT) outbreak in Brazil, Bastos region, and from other regions during 2002-2008. The molecular characterization was developed by restriction fragment length polymorphic analysis (RFLP) of polymerase chain reaction (PCR) products of glycoprotein E, G, thymidine kinase (TK) and regulatory protein of transcription (ICP4) gene, and by sequence analysis of TK and ICP4 gene. For ICP4 gene sequencing, two PCR assays have been developed for amplification of two different fragments of ICP4 gene. The PCR-RFLP and DNA sequencing techniques showed identical results, they could differentiate the field isolates from vaccine strains, tissue culture origin (TCO) and chicken embryo origin (CEO). The results showed that the severe outbreak in Bastos region was caused by a non-vaccine and virulent strain (Bastos strain); however it was possible to detect two isolates closely related to the CEO vaccine strain circulating during the outbreak. This study showed that the strain, which it caused the severe outbreak in Bastos region continue circulating in these region despite of the use of attenuate vaccines. In addition, the present research showed that isolates related to CEO and Bastos strains are circulating in commercial layer flocks located outside the Bastos region, and were involving in clinical cases of the disease. This study shows (1) the persistence of the wild field strain in Bastos

region (Bastos strain) despite of the control measures and the use of attenuate vaccines, (2) the dissemination of the Bastos and CEO strains to other regions, and (3) the efficacy of the strategy standardized in this study to characterization and differentiation of field isolates and vaccine strain.

Key words: Infectious laryngotracheitis. Molecular characterization. PCR-RFLP. Sequences analysis. Vaccine and Field strain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de trabalho.....	43	Tabela formatada
Figura 2 - Isolamento do VLTI em ovos embrionados SPF após inoculação pela MCA. Amostra de campo LTI-5.....	60	Excluído: .
Figura 3 - Isolamento do VLTI em ovos embrionados SPF após a inoculação pela MCA. Cepa TCO (LT-IVAX).....	60	Excluído: .
Figura 4 - Isolamento do VLTI em ovos embrionados SPF após a inoculação pela MCA. Cepa CEO (Nobilis ILT).....	60	
Figura 5 - Isolamento do VLTI em ovos embrionados SPF após a inoculação pela MCA. Cepa CEO (Laryngo-Vac).....	60	
Figura 6 - PCR do gene E de estirpes vacinais do VLTI. 1: cepa TCO (LT-IVAX), 2: Cepa CEO (Laryngo-Vac), 3: Cepa CEO (Nobilis ILT), 4: Controle negativo e 5: Marcador molecular (1 kb).....	61	
Figura 7 - PCR-RFLP de produtos do gene E digeridos com <i>Ddel</i> . 1: LTI-1, 2: TCO (LT-IVAX), 3: CEO (Laryngo-Vac) 4: CEO (Nobilis ILT), 5: LTI-47, 6: Controle negativo e 7: Marcador molecular (100 pb).....	62	
Figura 8 - PCR do gene G de estirpes campo e vacinais do VLTI. 1: Marcador molecular (1 kb). 2: LTI-1, 3: Cepa TCO (LT-IVAX), 4: Cepa CEO (Laryngo-Vac) e 5: Controle negativo.....	62	
Figura 9 - PCR-RFLP de produtos do gene G digeridos com <i>Nla</i> IV. 1: Marcador molecular (100 pb), 2: LTI-1, 3: LTI-7, 4: TCO (LT-IVAX), 5: CEO (Laryngo-Vac) 6: CEO (Nobilis ILT) e 7: Controle negativo.....	63	
Figura 10 - PCR-RFLP dos produtos do gene TK do VLTI digeridos com <i>Hae</i> III. 1: LTI-1, 2: LTI-27, 3: TCO (LT-IVAX), 4: CEO (Laryngo-Vac), 5: CEO (Nobilis ILT), 6: Controle negativo e 7: Marcador molecular (100 pb).....	64	
Figura 11 - PCR-RFLP dos produtos do gene TK do VLTI digeridos com <i>Nci</i> I. 1: LTI-1, 2: LTI-27, 3: TCO (LT-IVAX), 4: CEO (Laryngo-Vac), 5: CEO (Nobilis ILT), 6: Controle negativo e 7: Marcador molecular		

	(100 pb).....	65	
Figura 12 -	PCR-RFLP dos produtos do gene TK do VLTl digeridos com <i>Sau96I</i> . 1: LTI-1, 2: LTI-27, 3: TCO (LT-IVAX), 4: CEO (Laryngo-Vac), 5: CEO (Nobilis ILT), 6: Controle negativo e 7: Marcador molecular (100 pb).....	66	
Figura 13 -	PCR do gene ICP4 de estirpes vacinais do VLTl. 1: Marcador molecular (1 kb). 2: LTI-1, 3: Cepa TCO (LT-IVAX), 4: Cepa CEO (Nobilis ILT) e 5: Controle negativo.....	66	
Figura 14 -	PCR-RFLP dos produtos do gene ICP4 do VLTl digeridos com <i>HaeIII</i> . 1: Marcador molecular (100 pb). 2: LTI-1, 3: LTI-7, 4: TCO (LT- IVAX), 5: CEO (Laryngo-Vac) e 6: CEO (Nobilis ILT).....	67	Excluído:
Figura 15 -	PCR dos produtos do gene ICP4 do VLTl digeridos com <i>MspI</i> . 1: Marcador molecular (100 pb), 2: USP-1, 3: LTI-27, 4: TCO (LT-IVAX), 5: CEO (Laryngo-Vac) e 6: CEO (Nobilis ILT).....	68	
Figura 16 -	PCR-RFLP dos produtos do gene ICP4 do VLTl digeridos com <i>HinfI</i> . 1: Marcador molecular (100 pb). 2: LTI-1, 3: LTI-27, 4: TCO (LT-IVAX), 5: CEO (Laryngo-Vac) e 6: CEO (Nobilis ILT).....	68	
Figura 17 -	Alinhamento de nucleotídeos de um segmento do gene codificador da glicoproteína E (gE) do VLTl.....	72	
Figura 18 -	Árvore filogenética baseada em seqüências correspondentes ao gene E do VLTl.....	73	
Figura 19 -	Alinhamento e comparação de aminoácidos de um fragmento do gene TK de amostras de campo e cepas vacinais do VLTl.....	76	
Figura 20 -	Árvore filogenética construída com as seqüências de nucleotídeos do gene TK de amostras de campo e cepas vacinais.....	78	
Figura 21 -	PCR de um fragmento do gene ICP4 usando os <i>primers</i> ICP41F e ICP41R. 1: Amostra de campo, 2: Cepa TCO, 3: Cepa CEO, 4: Controle negativo e 5: Marcador molecular (100 pb).....	79	
Figura 22 -	PCR de um fragmento do gene ICP4 usando os <i>primers</i> ICP42F e ICP42R. 1: Marcador molecular (100 pb), 2: Amostra de campo, 3: Cepa TCO, 4: Cepa CEO e 5: Controle negativo.....	79	

Figura 23 - Alinhamento de aminoácidos de um segmento do gene ICP4 (localizados entre os nucleotídeos 143017 e 143704 do VLTl).....	83
Figura 24 - Alinhamento de aminoácidos de um segmento do gene ICP4 VLTl (localizados entre os nucleotídeos 146640 e 147275 do VLTl).....	84
Figura 25 - Arvore filogenética construída com seqüências de nucleotídeos compreendidas entre os nucleotídeos 143017 e 143704 do VLTl (gene ICP4).....	88
Figura 26 - Arvore filogenética construída com seqüências de nucleotídeos compreendidas entre os nucleotídeos 146640 e 147275 do VLTl (gene ICP4).....	89

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Amostras recepcionadas e processadas para a detecção do VLTl por PCR no Laboratório de Ornitopatologia (FMVZ-USP).....	41
Quadro 2 - <i>Primers</i> usados para a amplificação do gene E do VLTl.....	45
Quadro 3 - <i>Primers</i> usados para a amplificação do gene E do VLTl.....	48
Quadro 4 - <i>Primers</i> usados para a amplificação do gene G do VLTl.....	49
Quadro 5 - <i>Primers</i> usados para a amplificação do gene TK do VLTl.....	50
Quadro 6 - <i>Primers</i> usados para a amplificação do gene ICP4 do VLTl.....	52
Quadro 7 - <i>Primers</i> usados para a amplificação de dois fragmentos do gene codificador da proteína ICP4 do VLTl.....	54
Quadro 8 - Amostras testadas e diagnosticadas positivas para o VLTl a través da PCR no Laboratório de Ornitopatologia (FMVZ-USP)...	56
Quadro 9 - Ano de detecção, procedência, tipo de ave e uso de vacina das amostras positivas para LTI por PCR.....	57
Quadro 10 - Detecção do VLTl por órgão e pela presença ou ausência de sinais clínicos suspeitos da doença.....	59
Quadro 11 - Comparação dos padrões gerados por PCR-RFLP de quatro genes de isolados de campo e cepas vacinais do VLTl.....	69
Quadro 12 - Amostras seqüenciadas para uma região do gene codificador da glicoproteína E do VLTl publicadas no Genbank.....	71
Quadro 13 - Amostras seqüenciadas e resultados do seqüenciamento de uma região do gene timidina quinase de isolados de campo e cepas vacinais do VLTl.....	75
Quadro 14 - Amostras seqüenciadas e resultados do seqüenciamento de	

duas regiões do gene ICP4 de isolados de campo e cepas vacinais do VLTl.....	81
---	----

Quadro 15 - Caracterização de amostras de campo isoladas entre os anos 2002 a 2008 por PCR-RFLP e seqüenciamento do gene ICP4 do VLTl.....	90
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Cálculo de identidade de nucleotídeos de diversas seqüências do gene E do VLTl.....	73
-		
Tabela 2	Cálculo de identidade de nucleotídeos de seqüências do gene TK correspondentes a isolados de campo e cepas vacinais do VLTl.....	77
-		
Tabela 3-	Cálculo de identidade de nucleotídeos de seqüências do gene ICP4 correspondentes ao fragmento localizados entre os nucleotídeos 143017 a 143704 do VLTl.....	85
Tabela 4-	Cálculo de identidade de nucleotídeos de seqüências do gene ICP4 correspondentes ao fragmento localizados entre os nucleotídeos 146640 a 147275 do VLTl.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEO	=	origem de embrião de galinha
DNA	=	ácido desoxiribonucléico
<i>et al.</i>	=	e colaboradores
g	=	aceleração da gravidade terrestre (9,8m/s ²)
gE	=	glicoproteína E
gG	=	glicoproteína G
ICP4	=	proteína da célula infectada 4
LTI	=	laringotraqueíte infecciosa
M	=	molar
MCA	=	membrana corioalantóide
mg	=	miligrama
ml	=	mililitro
mM	=	milimolar
Ng	=	nanograma
PBS	=	tampão fosfato salino
PCR	=	reação em cadeia pela polimerase
pH	=	potencial hidrogeniônico
PI	=	pós-infecção
PCR	=	reacao em cadeia pela polimerase
RFLP	=	polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição
SPF	=	<i>specific pathogen free</i>
TCO	=	origem de cultivo celular
TE	=	tampão TRIS-EDTA
TK	=	timidina quinase
TRIS	=	hidroximetil-aminometano
U	=	unidade internacional

Nota: Visto terem seu uso consagrado na literatura técnica, algumas abreviaturas seguem as iniciais de sua grafia no idioma inglês.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	26
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	28
3	OBJETIVOS.....	38
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1	AMOSTRAS.....	39
4.1.1	Amostras de referência.....	39
4.1.2	Amostras de campo.....	39
4.2	DESENHO EXPERIMENTAL E DIAGRAMA DE FLUXO DE ATIVIDADES.....	40
4.3	EXTRAÇÃO DO ÁCIDO NUCLEÍCO.....	43
4.4	DETECÇÃO DO VLTÍ PELA REACÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) DIRIGIDA AO GENE DA GLICOPROTEÍNA E...	44
4.4.1	Primers.....	44
4.4.2	Primeira amplificação.....	44
4.4.3	Segunda amplificação (Nested).....	45
4.5	ISOLAMENTO DO VLTÍ.....	45
4.6	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VLTÍ POR PCR – ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE DO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (RFLP).....	46
4.6.1	Amplificação de um fragmento do gene da glicoproteína E (E).....	46
4.6.2	RFLP de um fragmento do gene E	47
4.6.3	Amplificação de um fragmento do gene da glicoproteína G (G).....	47
4.6.4	RFLP de um fragmento do gene G.....	48
4.6.5	Amplificação de um fragmento do gene timidina quinase (TK).....	48
4.6.5.1	Primers.....	48
4.6.5.2	Primeira amplificação.....	49
4.6.5.3	Segunda amplificação (Nested).....	49
4.6.6	RFLP de um fragmento do gene TK.....	50
4.6.7	Amplificação de um fragmento do gene da proteína reguladora da transcrição (ICP4).....	50

4.6.8	RFLP de um fragmento do gene ICP4.....	51
4.7	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VLTÍ POR SEQÜENCIAMENTO DE DNA.....	51
4.7.1	Amplificação de um fragmento do gene da glicoproteína E.....	51
4.7.2	Amplificação de um fragmento do gene timidina quinase (TK).....	52
4.7.3	Amplificação de um fragmento do gene da proteína reguladora da transcrição (ICP4).....	52
4.7.3.1	Desenho dos primers.....	52
4.7.3.2	Amplificação.....	53
4.7.4	Seqüenciamento de DNA.....	53
5	RESULTADOS.....	54
5.1	DETECÇÃO DO VLTÍ POR PCR.....	54
5.2	ISOLAMENTO DO VLTÍ.....	58
5.3	AMPLIFICAÇÃO DE UM FRAGMENTO DO GENE DA GLICOPROTEÍNA E (E).....	60
5.4	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VLTÍ POR PCR-RFLP DE UMA REGIÃO DO GENE E.....	60
5.5	AMPLIFICAÇÃO DE UM FRAGMENTO DO GENE DA GLICOPROTEÍNA G (G).....	61
5.6	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VLTÍ POR PCR-RFLP DE UMA REGIÃO DO GENE G	62
5.7	AMPLIFICAÇÃO DE UM FRAGMENTO DO GENE DA TIMIDINA QUINASE (TK).....	62
5.8	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VLTÍ POR PCR-RFLP DE UMA REGIÃO DO GENE TK.....	63
5.8.1	Enzima <i>HaeIII</i>.....	63
5.8.2	Enzima <i>NciI</i>.....	63
5.8.3	Enzima <i>Sau96I</i>.....	64
5.9	AMPLIFICAÇÃO DE UM FRAGMENTO DO GENE DA PROTEÍNA REGULADORA DA TRANSCRIÇÃO (ICP4).....	65
5.10	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VLTÍ POR PCR-RFLP DE UMA REGIÃO DO GENE ICP4.....	66
5.10.1	Enzima <i>HaeIII</i>.....	66

5.10.2	Enzima <i>MspI</i>	66
5.10.3	Enzima <i>HinfI</i>	67
5.11	COMBINAÇÃO DE PADRÕES DE RESTRIÇÃO OBTIDOS APÓS A DIGESTÃO DOS PRODUTOS DE PCR DO VLT1.....	68
5.12	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VLT1 POR SEQÜENCIAMENTO DE UMA REGIÃO DO GENE DA GLICOPROTEÍNA E.....	70
5.13	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VLT1 POR SEQÜENCIAMENTO DE UMA REGIÃO DO GENE TK.....	73
5.14	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VLT1 POR SEQÜENCIAMENTO DE UMA REGIÃO DO GENE ICP4.....	77
5.15	CONCORDÂNCIA ENTRE OS RESULTADOS DE PCR-RFLP E SEQÜENCIAMENTO DE DNA DO VLT1.....	89
6	DISCUSSÃO	91
7	CONCLUSÕES	100
	REFERÊNCIAS	101

1 INTRODUÇÃO

As doenças respiratórias de diferentes etiologias são responsáveis pelas maiores perdas econômicas à avicultura industrial. Entre elas, a laringotraqueíte infecciosa das aves (LTI) vem assumindo uma grande importância nos últimos anos devido às perdas econômicas geradas e as limitações das medidas profiláticas disponíveis para seu controle.

A LTI é uma doença respiratória aguda e altamente contagiosa que acomete o trato respiratório superior das aves. Embora não seja uma zoonose, sua notificação é obrigatória ao Serviço Oficial Brasileiro (BUCHALA, 2004). A importância desta doença realciona-se com as severas perdas econômicas que ocorrem devido à queda da produção de ovos, diminuição no desempenho de frangos, alta morbidade e mortalidade atingindo até 70% sobretudo em áreas de criação intensiva (GUY; BAGUST, 2008).

Desde seu primeiro relato em 1925, a doença foi descrita em vários países nos quais permanece endêmica, principalmente em áreas de criação intensiva, com alta densidade e com granjas de múltiplas idades, como na América do Norte, Europa, África, China, Sudoeste da Ásia, Nova Zelândia, Austrália, Polônia e Brasil. As formas severas e assintomáticas já foram descritas e continuam sendo relatadas até anos recentes em diferentes países (LINARES et al., 1994; COVER, 1996; HIDALGO, 2003; SMIETANKA, 2003; SELLERS et al., 2004; OJKIC et al., 2006; OLDONI; GARCIA, 2007; CHACON; FERREIRA, 2008).

O controle da doença é dificultado pelas características do agente etiológico e pelas limitações dos produtos imunológicos utilizados para erradicar a LTI das granjas e eliminar o vírus das aves infectadas. Assim, os vírus selvagens de campo e as cepas vacinais apresentam características que dificultam sua eliminação, por exemplo, capacidade de estabelecerem infecções latentes, habilidade de disseminação a partir de aves vacinadas para aves não vacinadas e a reversão da virulência (GUY; BARNES; SMITH, 1991; HUGHES et al., 1991).

Vacinas vivas atenuadas originadas de embrião de galinha (CEO) e originadas de cultivo celular (TCO) têm sido usadas em muitos países para o controle da doença, mas em muitos casos, as cepas vacinais, principalmente as

cepas CEO, foram envolvidas em surtos da doença (CHANG et al., 1997; KIRKPATRICK et al., 2006; OJKIC et al., 2006; NEFF; SUDLER; HOOP, 2008; OLDONI et al., 2008). Assim, a caracterização molecular do vírus circulante e envolvido em quadros clínicos da doença representa um grande desafio, o qual é dificultado pela baixa variabilidade genética viral.

Por outro lado, depois da introdução de vacinas atenuadas de diferente origens, é necessário o monitoramento contínuo das cepas circulantes e o emprego de técnicas moleculares que permitam genotipar e diferenciar as cepas isoladas (CLAVIJO; NAGY, 1997). A técnica de polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) oferece padrões de DNA de vírus isolados de campo e de vírus vacinais, permitindo avaliar o possível papel dos vírus vacinais nos surtos. A técnica de seqüenciamento genético e análise filogenética podem oferecer maiores informações para o entendimento das relações entre os isolados e a eficácia das vacinas.

O surto epidêmico da laringotraqueíte infecciosa iniciado no ano de 2002 na maior área de produção de ovos do Estado de São Paulo e do Brasil, região de Bastos, produziu altas perdas econômicas ao setor avícola. Assim, durante o surto inicial houve um aumento em três vezes nos gastos por medicação e mais de um milhão de aves mortas como consequência da infecção. Na tentativa de controlar a doença e evitar a disseminação viral para outras regiões, foram estabelecidas medidas de biossegurança na região afetada, incluindo a vacinação compulsória com uso de vacinas atenuadas. Depois da introdução das vacinas atenuadas para o controle da doença em 2004, foram observados quadros respiratórios leves na região de Bastos e quadros respiratórios severos suspeitos de LTI em outras áreas de criação intensiva do Estado de São Paulo e do país (CHACON et al., 2007). As origens dos vírus envolvidos nestes surtos permanecem até o momento ainda desconhecido. Além disso, a possibilidade de disseminação, tanto das cepas de campo, quanto das cepas vacinais, para outras regiões onde a vacinação é proibida, justifica a caracterização das cepas isoladas para conhecer a origem das cepas envolvidas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A laringotraqueíte infecciosa (LTI) é uma doença aguda e altamente contagiosa que afeta o trato respiratório superior das aves. A doença tem sido identificada em muitos países causando prejuízos econômicos elevados à indústria avícola intensiva (GUY; BAGUST, 2008).

O vírus da laringotraqueíte infecciosa (VLTi), taxonomicamente identificado como *Herpesvirus Galídeo 1*, é classificado na família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Iltovirus*. A subfamília compreende importantes patógenos para humanos e animais como o vírus herpes simples (*Simplexvirus*); o vírus da pseudorinha suína (*Varicellovirus*), e os alfa herpesvírus aviários (o vírus da doença de Marek e o vírus da LTI) (ROIZMAN, 1982; JONHSON et al., 1995; METTENLEITER, 2003).

A microscopia eletrônica revelou que a partícula do VLTi apresenta a morfologia típica dos herpesvírus, consistindo de um núcleo contendo DNA dentro de um capsídeo icosaédrico, o qual é coberto por uma camada protéica e um envelope com glicoproteínas incorporadas (ROIZMAN, 1996; METTENLEITER 2003; FUCHS et al., 2007;).

A informação genética está compreendida em uma molécula de DNA de fita dupla linear de aproximadamente 155 kb, consistindo de uma região longa única (UL) de 120 kb e uma região curta única (US) de 17 kb, flanqueada por duas regiões chamadas de seqüências repetidas invertidas (IR e TR) de 9 kb cada uma (JONHSON et al., 1991; WILD; COOK; COCHRAN, 1996). Embora o DNA do VLTi encontre-se na classe D dos genomas da família *Herpesviridae*, o mesmo apresenta características exclusivas, como uma inversão interna dentro da região UL e genes específicos, num total de 21 genes identificados (GRIFFIN, 1989; FUCHS et al., 2000).

As glicoproteínas são os constituintes virais responsáveis pela estimulação da resposta imune humoral e celular, sendo importantes na interação vírus-hospedeiro (SPEAR, 1984; METTENLEITER, 1991; ROIZMAN; SEARS, 1996). York et al. (1990) descreveram que os principais compostos imunogênicos do vírus são as glicoproteínas B (gB), C (gC), D (gD), X (gX) e K (gK). Estudos

funcionais das glicoproteínas dos herpesvírus revelaram que as gB, gD, gH e gK são essenciais para a replicação viral, enquanto que gC, gE, gG, gI e gJ, não são essenciais, mas estão envolvidas em importantes funções virais, como o reconhecimento das células alvo e na virulência (METTENLEITER, 1991; BABIC et al., 1996).

A glicoproteína E (gE) é importante na expressão da virulência do vírus da pseudorraiva (VPr) e do herpesvírus felino e dependendo da célula hospedeira, está envolvida na disseminação célula-célula e na liberação do (VPr) da célula infectada (METTENLEITER, 1991; BABIC et al., 1996; KRUGER; SUSSMAN; MAES, 1996). Num estudo dirigido por Kruger, Sussman e Maes (1996), com cepas do herpesvírus felino que apresentavam deleção dos genes para as gE e gI, demonstrou-se que estas glicoproteínas eram importantes imunogênicos. Entretanto, análises das seqüências de 20 cepas do VLTl, indicaram que a gE possuía regiões altamente conservadas (HUMBERD et al., 2002).

Estudos feitos com diferentes herpesvírus mutantes com deleção do gene codificador da timidina quinase (TK) demonstraram diminuição da virulência, alteração do mecanismo neuroinvasor e redução da capacidade de reativação viral da fase de latência (COEN et al., 1989; EFSTATHION, 1989; KRUGER, SUSSMAN; MAES 1996; FERRARI et al., 2000). Schitzlein et al. (1995), mostraram que a deleção do gene TK não afeta a resposta imunológica contra o VLTl. De outro lado, a análise de seqüenciamento do gene TK de vários herpesvírus mostram que esta proteína (TK) é altamente polimórfica, com algumas poucas regiões conservadas dispersas (NUNMBERG, 1989; SCOTT; ROSS; BINNS, 1989).

O VLTl codifica a glicoproteína G (gG), uma glicoproteína conservada em muitos membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* (WILD; COOK; COCHRAN, 1996; KONGSUWAN et al., 1993). Estudos com alfa herpesvírus com deleção da gG mostraram que este gene não é essencial para o crescimento *in vitro* do vírus da pseudorraiva (PRV), herpesvírus simples 1 (HSV-1), herpesvírus bovino 1 (BHV-1), herpesvírus eqüino 1 (EHV- 1) e herpesvírus eqüino 4 (EHV-4) (DEVLIN et al., 2006; METTENLEITER; 1991). Num estudo posterior, Devlin et al. (2006) demonstraram que a gG é um fator de virulência do VLTl e que a deleção do gene codificador causa uma marcada atenuação do vírus no hospedeiro natural.

A proteína reguladora de transcrição, também conhecida como proteína da célula infectada 4 (ICP4) é produzida antes do início do ciclo de replicação. Ela é responsável pela regulação da expressão dos genes precoces e tardios na infecção dos herpesvírus (JONHSON, et al., 1995; CHANG, 1997; GRAHAM et al, 2000). A ICP4 tem capacidade de auto-regulação e regula a expressão de outros genes por ligação direta nos sítios de alta afinidade dentro dos promotores dos genes de infecção precoce (JONHSON et al., 1995).

Embora o VLTI seja envelopado, apresenta alta resistência aos vários desinfetantes comerciais utilizados pela indústria avícola na presença de matéria orgânica, mas tem se mostrado sensível ao clorofórmio, éter, cresol 3%, fenol 5% e iodóforos. Há relatos que indicam que a partícula viral pode se manter infectante no exsudato traqueal e na carcaça das aves por períodos de 10 a 100 dias, em temperatura de 13 a 23°C (RUANO; EL-ATTRACHE; VILLEGAS, 2001; GUY; BAGUST, 2008).

Apesar de todas as cepas do VLTI serem antigenicamente similares, a virulência das mesmas varia consideravelmente, resultando em infecções que variam de subclínicas (forma endêmica) até uma doença respiratória severa com alta mortalidade (forma epizootica) (GUY; BAGUST, 2008). A forma enzoótica ou subclínica da infecção vem se manifestando em áreas de criação intensiva. Nestes casos, podem ser observadas leve traqueíte mucóide, sinusite, conjuntivite e baixa mortalidade. Os sinais clínicos associados com a forma severa incluem depressão, dispnéia, tosse, descarga nasal, expectoração de secreção sanguinolenta e alta mortalidade (SELLERS et al., 2004; GUY; BAGUST, 2008).

As galinhas são os hospedeiros naturais do vírus da laringotraqueíte, sendo susceptíveis as aves de todas as idades, porém, os sinais clínicos são principalmente observados em aves adultas (COVER, 1996). No entanto, ainda não está bem esclarecida a susceptibilidade ligada à linhagem genética ou ao sexo. Faisões também podem ser afetados por este vírus (IZUCHI; HASEGAWA, 1982). Além disso, o VLTI foi também isolado de galinha d'angola procedente de uma granja com histórico de doença respiratória (BAUTISTA, 2003). Experimentalmente, a doença foi reproduzida em perus e soroconversão foi encontrada em patos (COVER, 1996). Recentemente, Portz et al. (2008),

relataram infecção natural em perus comerciais, apresentando sinais clínicos da doença.

As aves infectam-se com o VLTÍ através do trato respiratório superior e por via ocular, sendo as aves com infecção clínica as principais transmissoras do vírus. Outras fontes de transmissão implicadas em surtos são as aves com infecções latentes, materiais de cama e fômites contaminados. Os sinais clínicos geralmente aparecem 6 a 12 dias depois da exposição natural (COVER, 1996).

O VLTÍ multiplica-se principalmente no epitélio da laringe e traquéia, e em outras membranas e tecidos como conjuntiva, seios nasais, sacos aéreos e pulmões. O vírus está presente na traquéia e na secreção traqueal por 6 a 8 dias pós-infecção (PI) e pode manter-se em baixa concentração por até 10 dias PI (BAGUST, 1986).

Uma característica das infecções por herpesvírus é a capacidade do vírus de permanecer no hospedeiro infectado após da infecção aguda em um estado de latência (METTENLEITER, 1991). O vírus pode ser encontrado 4 a 7 dias após a infecção no gânglio trigêmeo e pode permanecer neste local por até 15 meses, mais também na traquéia o vírus pode ser encontrado em estado de latência (BAGUST, 1986; WILLIAMS et al., 1992b). O processo de latência ocorre pela integração do DNA genômico viral ao DNA da célula hospedeira ou pela manutenção do DNA viral sob forma circular no núcleo das células de modo extracromossômico. Isto acontece tanto com amostras de campo quanto com amostras vacinais do vírus e tem uma óbvia implicação na eliminação do vírus no animal infectado e no controle da doença sobre a população aviária. Uma vez latente, o vírus não é apresentado ao sistema imune por não haver expressão de suas proteínas, o que impede tanto a ação do sistema imune na defesa do animal acometido quanto à detecção de resposta imune por provas sorológicas. Com isso, uma fonte de infecção não é detectada, não sendo excluída do lote, podendo vir a transmitir o VLTÍ para aves susceptíveis de modo esporádico ao longo de toda a vida (BAGUST, 1986; BAGUST; CALNEK; WFAHEY, 1986; HUGHES et al., 1987; GUY et al., 1989; JONHSON et al., 1991; WILLIAMS et al., 1992a; HAN; KIM, 2003;). A expressão do DNA viral latente em vírions é promovida por fatores estressantes e alterações hormonais ligados às aves, como início da postura, a entrada da ave em um lote ou a muda forçada em aves de postura (HUGHES et

al., 1987; HUGHES et al., 1989; WILLIAMS et al., 1992a). O VLTi reativado do estado latente tem a capacidade de causar doença com o mesmo grau de severidade que os observados por vírus isolados de casos de infecção aguda. Da mesma forma, o vírus vacinal que se dissemina depois de um estado de latência também pode causar o quadro clínico em aves susceptíveis (HUGHES et al., 1991; WILLIAMS et al., 1992a).

É bem documentado o potencial do VLTi de baixa virulência de se transformar em vírus de alta virulência capaz de produzir doença clínica. Estudos experimentais utilizando vírus de baixa virulência, isolados de casos clínicos e de vacinas, demonstraram um aumento da virulência depois da passagem ave-ave (GUY; BARNES; SMITH, 1991; KOTIW; WILKS; MAY, 1995).

Foi relatado que diferentes cepas de *Alphaherpesvirus* têm capacidade de recombinação *in vivo* e *in vitro* (GLAZENBURG et al., 1995; KINTNER; ALLAN; BRANT, 1995; FUJITA et al, 1998). Experimentalmente, depois de uma infecção mista com duas cepas pouco virulentas do herpesvírus simples foi obtida uma cepa recombinante com maior virulência que as cepas originais (BRAUNDT; GRAU, 1990; JAVIER; SEDARANI; STEVENS, 1986). Bem-Porat, Deatly e Easterday, 1984¹ (1984 apud WHETSTONE; WHEELER; REED, 1986, p. 1793) demonstraram, em vírus de campo de pseudorabia, alterações nos padrões de restrição causados pela deleção ou aquisição de seqüências que não afetavam a viabilidade viral (WHETSTONE; WHEELER; RED, 1986). Não existem estudos sobre recombinação do VLTi, mas se pode considerar que o incremento da virulência das cepas vacinais pode ser devido a mutações em pontos de genes relacionados à virulência ou pela recombinação de cepas virulentas e não virulentas. Amostras isoladas de campo com padrões de restrição semelhantes tanto de cepas vacinais e como de outras cepas virulentas de campo justificam esta hipótese (HAN; KIM, 2001a).

A forma endêmica ou subclínica da infecção vem se manifestando em áreas de criação intensiva. Nestes casos, podem ser observados sinais inespecíficos como uma leve traqueíte mucóide, sinusite, conjuntivite, morbidade variável e baixa mortalidade (HIDALGO, 2003; TIMURKAAN et al., 2003;

¹ BEN-PORAT, T.; DEATLY, A.; EASTERDAY, B. Latency of pseudorabies virus. In: WITTMANN, G.; GASKELL, R. **Latent herpes virus infections in veterinary**. Boston: Martinus, 1984. p. 365-383.

SELLERS et al., 2004). No entanto, os sinais clínicos associados com a forma epidêmica incluem depressão, dispnéia, espirro, descarga nasal, conjuntivite e expectoração de secreção sanguinolenta. A taxa de morbidade é alta (100%) e a mortalidade poderá chegar a 70%, embora se situem entre 10 e 40% (HAYASHI et al., 1985; COVER, 1996; SELLERS et al., 2004; GUY; BAGUST, 2008). Um achado comum em galinhas acometidas pelo VLTl de alta virulência é o tampão de cáseo que se forma na luz traqueal. Isto impede a respiração normal da ave, fazendo-a esticar o pescoço para respirar, um sinal clínico importante nesta doença. As aves que apresentam altas quantidades de exsudatos caseosos com dispnéia produzem estertores (COVER, 1996).

As lesões mais importantes são observadas na laringe e na traquéia, onde pode ser encontrado um processo inflamatório que pode variar de mucoso a hemorrágico. Na traquéia, lesões diftericas ou hemorrágica na mucosa, com tecido necrosado ao longo da mesma podem ser encontradas, podendo estender-se até os brônquios, pulmões e sacos aéreos. Também pode ser encontrada intensa hemorragia na luz traqueal (LINARES et al., 1994). As aves que manifestam a forma branda da doença podem apresentar edema, inflamação e congestão do epitélio da conjuntiva e seios infraorbitais, além de traqueíte catarral que se manifesta de forma branda (COVER, 1996; HIDALGO, 2003; SELLERS et al., 2004).

A replicação viral na traquéia leva ao aparecimento de lesões microscópicas como infiltração de linfócitos, histiocitos e plasmócitos na mucosa e na submucosa, perda de cílios, edema celular e formação de sincícios. Estas mudanças levam a descamação epitelial com exposição de capilares e subseqüentes hemorragias. Corpúsculos de inclusão intranucleares (CI) podem ser visíveis entre o primeiro e o quinto dia PI, desaparecendo devido à descamação do epitélio (GUY; BARNES; SMITH, 1991; GUY; HIDALGO, 2003; BAGUST, 2008).

O diagnóstico da doença requer testes de laboratório, pois dependendo do grau de virulência do vírus envolvido, o quadro clínico pode variar em intensidade (TIMURKAAN et al., 2003). Além disso, muitos sinais clínicos e lesões produzidas pelo VLTl também são causados por outros agentes patógenos respiratórios. Somente nos casos de infecção aguda com alta mortalidade e expectoração de

sangue, a doença pode ser diagnosticada baseada apenas no quadro clínico e no histórico do lote, mas o diagnóstico laboratorial é requerido para a doença branda (ABBAS; ANDREASEN; JACKWOOD, 1996).

O diagnóstico laboratorial inclui técnicas histopatológicas, isolamento viral, detecção de antígenos, detecção de anticorpos e detecção de DNA (HUGHES; JONES, 1988). Várias técnicas foram descritas para o diagnóstico do VLTi. A presença de anticorpos contra o VLTi pode ser demonstrada por soroneutralização e ensaios imunoenzimáticos ligados a enzima, porém, as técnicas sorológicas oferecem baixa sensibilidade devido à baixa soroconversão das aves infectadas (BAUER et al., 1999; SANDER; THAYER, 1997). A histopatologia tem sido usada para a detecção de células sinciciais e corpúsculos de inclusão intranuclear, porém, como o epitélio infectado é destruído por necrose e descamação os corpúsculos de inclusão podem ser observados somente na traquéia entre os dias 1 a 5 pós-infecção (ABBAS; ANDREASEN; JACKWOOD, 1996; HUMBERD et al., 2002; TIMURKAAN et al., 2003). O vírus pode ser isolado de material de campo em embriões de galinha livres de patógenos específicos (SPF) inoculados via membrana corioalantóide (MCA) ou por isolamento em cultura de rim de embrião de galinha (CEK), fígado de embrião de galinha (CELi), ou em células de rim de frango (HUGHES et al., 1991; SCHNITZLEIN et al., 1994). Embora o isolamento seja uma técnica ainda aceita devido aos seus resultados satisfatórios, é uma técnica demorada (HUGHES; JONES, 1988). A reação em cadeia pela polimerase (PCR) tem sido usada para a detecção de DNA viral em traquéia e outros tecidos (WILLIAMS et al., 1992a; ABBAS; ANDREASEN; JACKWOOD, 1996; ALEXANDER; NAGY, 1997; ALEXANDER; KEY; NAGY, 1998; CHACÓN; FERREIRA, 2008;) mostrando ser uma técnica sensível e rápida. Recentemente, ensaios de PCR em tempo real foram descritos para a detecção do VLTi (CREELAN et al., 2006; CALLISON et al., 2007). Várias estratégias usando a PCR foram empregadas para a caracterização molecular e estudos de epidemiológicos da doença (ABBAS; ANDREASEN; JACKWOOD, 1996; CHANG et al., 1997; HAN; KIM 2001b; OJKIC et al., 2006; OLDONI et al., 2008).

Na atualidade, a medida mais efetiva de prevenção da doença é evitar a entrada do vírus através de medidas de biossegurança, sendo o uso de vacinas restrito a áreas onde a doença é endêmica. Apesar do uso das vacinas para o

controle, a doença continua causando enormes perdas à avicultura mundial (CLAVIJO; NAGY, 1997). Foi demonstrado que as vacinas vivas modificadas, tanto as originadas de embrião de galinha (CEO) como as de cultivo celular (TCO), são eficientes no desenvolvimento de resistência em populações susceptíveis, mas as vacinas usadas comercialmente têm sido associadas com vários efeitos adversos como a disseminação do vírus vacinal às aves não vacinadas, insuficiente atenuação viral, produção de aves portadoras com infecção latente, o que contribui à permanência do vírus nas populações aviárias, e incremento da virulência como resultado da passagem *in vivo* (ave a ave) (GUY et al., 1989; CHANG et al., 1997; GARCIA; RIBLET, 2001; HAN; KIM, 2001a; HAN; KIM, 2003).

Além disso, foram encontradas subpopulações virais do VLTl em preparações vacinais do mesmo vírus propagadas em embrião de galinha, e os autores sugerem que no campo pode acontecer uma seleção destas subpopulações com posterior recirculação destas cepas derivadas de vacina em aves não imunizadas e que pode levar ao aparecimento de surtos depois da reversão da virulência (GARCIA; RIBLET, 2001).

Estudos de patogenicidade e epidemiológicos indicam que as cepas vacinais procedentes de embrião de galinha são uma possível fonte de surtos, depois que vírus isolados em casos clínicos da doença não apresentaram diferenças distinguíveis nos padrões de restrição com tais vacinas (NEFF; SUDLER; HOOP, 2008; GARCIA; RIBLET, 2001). O aumento da virulência demonstrado depois da passagem *in vivo*, e os padrões de restrição de muitos trabalhos sugerem que muitos surtos podem ser originados por mutações dos vírus vacinais com aumento da virulência (GUY; BARNES; SMITH, 1991; KEELER et al., 1993). Keller et al. (1992), encontraram grande divergência entre cepas de referência antigas e vacinais comparadas com as cepas isoladas em surtos na Pensilânia, sugerindo que os surtos poderiam ser o resultado de mutações das vacinas propagadas em embrião, depois de passagens *in vivo*.

As técnicas baseadas na reação em cadeia pela polimerase (PCR) são rápidas e sensíveis para a detecção do VLTl, mas não diferenciam cepas de campo das cepas vacinais. A técnica de polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) tem sido usada com sucesso em estudos de

epizootiologia e epidemiologia molecular de muitos herpesvírus para se avaliar o possível papel dos vírus vacinais em surtos da doença (WHETSTONE, WHEELER; RED, 1986; GUY et al., 1989; ANDREASEN; GLISSON; VILLEGAS, 1990). O RFLP a partir do DNA viral inteiro permitiu a diferenciação de cepas do VLTi, convertendo-se em uma ferramenta importante em estudos que procuram determinar o possível envolvimento das cepas vacinais em surtos de LTI (LEIB et al., 1986; GUY et al., 1989; ANDREASEN; GLISSON; VILLEGAS, 1990; KELLER et al., 1992; KEELER et al., 1993; HAN; KIM, 2001b; GUY; BAGUST, 2008). Assim sendo, a RFLP de produtos da PCR de múltiplos genes do VLTi é uma alternativa para a detecção de diferenças menores em áreas conhecidas do genoma. As técnicas de PCR e RFLP foram utilizadas em forma conjunta com sucesso em estudos epidemiológicos para a diferenciação de cepas campo e cepas vacinais, permitindo a diferenciação dos isolados, incluindo as cepas CEO e TCO. Esta metodologia foi utilizada com êxito em vários países para a caracterização das cepas de campo circulantes e inclui a amplificação da proteína reguladora de transcrição ou proteína da célula infectada 4 (ICP4), timidine quinase (TK), glicoproteína G (gG) e a glicoproteína E (gE) (CHANG et al., 1997; GRAHAM et al., 2000; GARCIA; RIBLET, 2001; CREELAN et al., 2006; KIRKPATRICK et al., 2006; OJKIC et al., 2006; OLDONI; GARCIA, 2007).

Entre os genes utilizados para diferenciação de cepas, o gene ICP4 mostrou-se de grande utilidade para a discriminação entre cepas TCO, CEO e selvagens, após a digestão com endonucleases (OLDONI; GARCIA, 2007; GRAHAM et al., 2000; CHANG et al., 1997). Embora este gene apresente alta semelhança entre as diferentes cepas do VLTi, o que levou a desenvolver ensaios de PCR para detecção viral (CREELAN et al., 2006), é possível encontrar regiões variáveis que podem ser analisadas para a diferenciação de cepas.

A diferenciação por PCR-RFLP tem se mostrado eficiente em vários países para diferenciação dos isolados do VLTi, porém esta metodologia inclui a amplificação simultânea de vários genes e a necessidade de propagação viral para a amplificação de fragmentos maiores de 2 kb (KIRKPATRICK, et al., 2006; OLDONI et al., 2007). Inclusive, em vários estudos não foi possível discriminar entre os dois tipos de vacinas atenuadas usando a análise de PCR-RFLP (NEFF; SUDLER; HOOP, 2008).

A análise de seqüenciamento dos genes TK, gG e UL47 foi também utilizada para a diferenciação dos isolados do VLTI (HAN; KIM, 2001a; OJKIC et al., 2006). O seqüenciamento de DNA permite uma maior discriminação entre diversas amostras ou isolados virais, uma vez que o número de caracteres gerados é maior do que, por exemplo, aquele correspondente a RFLP, tornando possível, em casos de amostras encontradas como idênticas pelos métodos anteriormente citados, uma mais ampla comparação quando da utilização das seqüências geradas para a construção de árvores filogenéticas em conjunto com seqüências derivadas de bancos de dados, como, o GenBank, tornando mais acurada a epidemiologia molecular de doenças virais (MIYAKI; RUSSO; PEREIRA, 2001). Esta metodologia além de ter maior potencial discriminatório, pode permitir acompanhar prováveis eventos de recombinação e evolução, assim como ocorre com outros patógenos aviários. Dessa forma, a análise de seqüências do gene TK pode ser usada para a diferenciação entre isolados de alta e baixa virulência (HAN; KIM, 2001a).

No final do ano de 2002, foi relatado um surto da LTI de características epidêmicas em galinhas de postura comercial na região de Bastos (Tupã), Estado de São Paulo. O vírus foi isolado em ovos embrionados e detectado por técnicas de PCR e caracterizado molecularmente (VILLARREAL et al., 2004; CHACON et al., 2007). O VLTI disseminou-se rapidamente na região que é responsável por mais de 30% da produção de ovos do Estado de São Paulo e 15% da produção nacional e é caracterizada por criações intensivas com variados níveis de biossegurança (SAGESSE, 2005). Os surtos caracterizavam-se por sinais respiratórios severos e transitórios, queda na produção de ovos, diminuição do consumo de ração, e mortalidade que atingiu até mais de 1 000 000 aves na região de Bastos, levando a grandes perdas econômicas. Medidas quarentenárias foram implantadas pelos avicultores sob a coordenação das autoridades sanitárias estaduais. Como medida de controle da doença foi iniciada uma campanha de vacinação usando vacinas vivas importadas de embrião de galinha (CEO) e vacinas de origem de cultivo celular (TCO). Desde a introdução da primeira vacina até hoje, surtos de diferentes intensidades foram relatados na região e áreas vizinhas, dentro e fora do Estado de São Paulo, sugerindo que as medidas quarentenárias e o uso da vacina, não evitaram a disseminação.

3 OBJETIVOS

- Detectar pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) dirigida ao gene codificador da glicoproteína E (gE) o vírus da laringotraqueíte infecciosa (VLTi) em amostras de aves comerciais com e sem sintomatologia suspeita da doença (LTI) da região de Bastos e outras localidades do Estado de São Paulo no período de 2002 a 2008.
- Estabelecer o padrão de restrição dos vírus da LTI detectados em aves comerciais entre 2002 e 2008, e os vírus de origem vacinal utilizados no Brasil até 2008, utilizando a técnica de polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) dirigidos aos genes codificadores da glicoproteína E (E), glicoproteína (G), timidina quinase (TK) e da proteína reguladora da transcrição (ICP4), usando as enzimas de restrição *DdeI* (gene E), *NlaIV* (gene G), *HaeIII*, *NciI*, *Sau96I* (gene TK), *Msp I*, *HaeIII* e *Hinp1I* (gene ICP4).
- Caracterizar molecularmente os vírus da LTI detectados em aves comerciais no período de 2002 a 2008 e os vírus de origem vacinal utilizados no Brasil até 2008 através do seqüenciamento dos genes codificadores da glicoproteína E (gE), timidina quinase (TK) e proteína reguladora da transcrição (ICP4).

4 MATERIAL E METODOS

4.1 AMOSTRAS

4.1.1 Amostras de referência

Para as técnicas de PCR e o isolamento viral foram utilizados como controle positivo uma amostra fornecida pelo Laboratório de Referência Animal (LANAGRO) do Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento (MAPA), Campinas - São Paulo) e as seguintes cepas vacinais:

1. Vacina viva originária de cultivo celular (TCO) LT-IVAX (cepa Samberg) (Laboratório Schering Plough).
2. Vacina viva originária de embrião de galinha (CEO) Laryngo-vac (Laboratório Fort Dodge).
3. Vacina viva originária de embrião de galinha (CEO) Nobilis ILT (cepa Serva) (Laboratório Intervet do Brasil).

4.1.2 Amostras de campo

O presente estudo inclui amostras coletadas durante o primeiro surto clínico da doença na região de Bastos, anos 2002 a 2003, e amostras coletadas depois da introdução de vacinas vivas atenuadas naquela região (ano 2004). No estudo também foram incluídas amostras encaminhadas ao laboratório de Ornitopatologia (FMVZ-USP) procedentes de casos clínicos suspeitos da doença de laringotraqueíte infecciosa procedentes de granjas localizadas fora da região de Bastos (Quadro 1). As amostras coletadas na região de Bastos após a liberação do uso das vacinas atenuadas foram coletadas com o objetivo de genotipar as

cepas circulantes, embora nenhum caso clínico da doença tenha sido registrado desde o ano 2004.

Data de envio (Ano)	Data de processamento	Amostras recepcionadas	Amostras testadas
2002	2004	6	6
2003	2004	51	51
2004	2005	87	87
2005	2005	28	28
2006	2006	20	20
2007	2007	92	92
2008	2008	147	147
TOTAL		431	431

Quadro 1 - Amostras recepcionadas e processadas para a detecção do VLTl por PCR no Laboratório de Ornitopatologia (FMVZ-USP)

A maioria das amostras processadas foi encaminhada pelos laboratórios do Instituto Biológico, Bastos, SP e pelo LANAGRO.

Para a detecção do VLTl foram coletadas amostras de traquéia, conjuntiva e gânglio trigêmeo de cinco aves. Foi realizado “pool” de amostras de traquéia e conjuntiva, enquanto que as amostras de gânglio trigêmeo foram processadas separadamente para a detecção de possíveis casos de infecção latente.

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL E DIAGRAMA DE FLUXO DE ATIVIDADES

Todas as amostras recepcionadas seguiram o seguinte protocolo:

- a. O vírus da laringotraqueíte (VLTl) foi pesquisado pela técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR) amplificando uma região conservada do gene que codifica a glicoproteína E do VLTl. Esta reação foi utilizada para a triagem do VLTl.

- b. As amostras positivas na fase de triagem foram propagadas em ovos embrionados de galinha SPF por inoculação pela membrana corioalantóide (MCA) na tentativa de aumentar o título viral.
- c. As amostras positivas na triagem foram submetidas a PCR, amplificando segmentos dos genes que codificam para as proteínas E, G, timidina quinase (TK) e ICP4.
- d. Os fragmentos amplificados (1870 pb do gene E, 2931 pb do gene G, 1296 pb do gene TK e 4.9 kb da ICP4) foram submetidas à técnica de polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), utilizando as enzimas *DdeI* (E); *NlaIV* (G); *HaeIII*, *NciI*, *Sau96I*, (TK); *MspI*, *HaeIII* e *HinfI* (ICP4).
- e. Foram desenhados dois pares de *primes* para a amplificação de duas regiões do gene codificador da proteína ICP4.
- f. Os fragmentos amplificados após a reação de PCR do gene E (219pb), gene TK (649 pb) e do gene ICP4 (688 e 631 pb) foram purificados, quantificados e submetidos à reação de seqüenciamento de DNA.

Estas etapas podem ser melhor entendidas no seguinte diagrama de fluxo (Figura 1).

Figura 1 - Fluxograma de trabalho

4.3 EXTRAÇÃO DO ÁCIDO NUCLÉICO

A extração de DNA para a detecção do VLT1 foi realizada seguindo o protocolo citado por Chomksinsky et al., (1993):

- a. Macerado de amostras de gânglio trigêmeo e um pool de macerado de conjuntiva e traquéia foram diluídos em tampão fosfato salino (PBS) 0,01 M, pH 7,2, para 20 % da amostra.
- b. A suspensão obtida foi centrifugada a 12.000 x g/ 20 minutos/ 4°C.
- c. Duzentos microlitros da suspensão de cada amostra foram homogeneizados com 600 µl de tiocianato de guanidina – fenol.
- d. Agitação em vórtex por 15 segundos.
- e. Em seguida foram adicionados 100 µl de clorofórmio e agitado por 15 segundos.
- f. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 5 minutos a 4°C.
- g. O sobrenadante (+/- 400µl) foi transferido para outro tubo contendo 600 µl de propanol.
- h. Depois de agitação por 15 segundos, as amostras foram colocadas por duas horas a – 20°C.
- i. Logo, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 20 minutos a 4°C.
- j. Depois de descartar o sobrenadante, o *pellet* foi lavado com 500 µl de etanol 70%.
- k. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 20 minutos a 4°C.
- l. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram colocados em banho seco a 37 °C por 5 minutos.
- m. Finalmente, foram adicionados 30 µl de TE e as amostras foram colocadas a 37°C por 15 minutos.

4.4 DETECÇÃO DO VLTl PELA REACÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) DIRIGIDA AO GENE DA GLICOPROTEÍNA E

Para a detecção do VLTl foi utilizada uma técnica de PCR para a amplificação de uma região do gene codificador da glicoproteína E (gE), localizado na região curta única (US) (CHACÓN; FERREIRA, 2008).

4.4.1 Primers

Os *primers* e as condições descritas por Chacón e Ferreira (2008) foram utilizados para a amplificação de um segmento do gene E do VLTl. Como *primers* externos foram utilizados os iniciadores GE1S e GE2AS para a amplificação de um fragmento de 524 pb do gene E do VLTl. Como *primers* internos, foram utilizados os *primers* denominados de GE3S e GE4AS visando a amplificação de um fragmento de 219 pb a partir do primeiro produto da PCR (Quadro 2).

PRIMERS	SEQÜÊNCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
GE1S	CGTATACCATCCTACAGACGGCA	524
GE2AS	CGTACAATGGTTCGGTCTTGGA	
GE3S	AGTCCTCTTATAGCCATCCCCA	219
GE4AS	CACCCCCGCGACGACGAAGT	

Quadro 2 - *Primers* usados para a amplificação do gene E do VLTl.

4.4.2 Primeira amplificação

Cinco microlitros do DNA extraído foram adicionados ao PCR mix contendo 1x PCR Buffer (InvitrogenTM), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 pmol/μL de cada *primer*

(GE1S e GE2AS), 1,5mM de $MgCl_2$, 25,25 μL de água ultra-pura e 1,25U Taq DNA polimerase para uma reação final de 50 μL e submetidos a 39 ciclos de 94°C/1' para denaturação do DNA, 58°C/1' para hibridização dos primers e 72°C/1'30" para extensão do DNA e, seguido de 72°C/10' para extensão final.

4.4.3 Segunda amplificação (Nested)

A fase do nested-PCR foi realizada com 5 μL do produto da primeira amplificação adicionado ao mix contendo 1x PCR Buffer (InvitrogenTM), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 pmol/ μL de cada *primer* (GE3S e GE4AS), 1,5mM de $MgCl_2$, 25,25 μL de água ultra-pura e 1,25U Taq DNA polimerase para uma reação final de 50 μL e submetidos a 39 ciclos de 94°C/1', 58°C /1' e 72°C/1'30" seguidos por 72°C/10' para extensão final.

Os produtos do *nested* foram analisados em gel de agarose a 1,5 % e corados com brometo de etídeo 0,5 $\mu g/mL$, foram considerados positivos os produtos que apresentaram um fragmento de 219 pb.

4.5 ISOLAMENTO DO VLTÍ

As amostras positivas na triagem, usando a técnica de PCR para o gene E, foram inoculadas em ovos embrionados de galinhas livres de patógenos específicos (SPF) com o objetivo de aumentar o título viral, obtendo deste modo material suficiente para as técnicas adicionais (PCR-RFLP). As três amostras vacinais também foram inoculadas em ovos embrionados para observar as lesões, as quais foram comparadas com as produzidas pelas amostras de campo. O inóculo foi preparado da seguinte forma:

- a. Um *pool* de macerado de traquéia, conjuntiva e gânglio trigêmeo de cada granja foi diluída em solução salina fosfatada (PBS) 0,01 M, pH 7,2 (1:1).
- b. A suspensão foi centrifugada a 12.000 x g/ 20 minutos/ 4°C.

- c. Três mililitros do sobrenadante foram recuperados e passados por filtro de 0,2 µm de diâmetro (Milipore®), adicionando-se 30 µl de gentamicina de (30 mg/ml) ao inóculo filtrado.
- d. 0,2 µl de cada amostra foi inoculado em cinco ovos embrionados SPF de 9 a 10 dias de idade pela membrana corioalantóide (MCA), e os ovos foram incubados a 37°C por 5 dias.
- e. Os ovos foram observados sob ovoscopia, duas vezes ao dia para a detecção de mortalidade. Os ovos que apresentaram morte embrionária nas primeiras 24 horas foram eliminados.
- f. Ao quinto dia pós-inoculação (PI) as MCA foram colhidas.
- g. As MCA colhidas foram ressuspensas em PBS 0,01 M, pH 7,2, maceradas, filtradas e tratadas com antibiótico como detalhado nos itens a-c e 0,2 µl desta passagem foram inoculadas como descrito no item d, num total de 5 passagens.
- h. Após a terceira passagem, os ovos inoculados foram testados para a detecção do VLTi pela técnica de *nested*-PCR através da amplificação do gene E.

4.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VLTi POR PCR-ANÁLISE DE POLIMORFISMO DE COMPRIMENTO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (RFLP)

4.6.1 Amplificação de um fragmento do gene da glicoproteína E (E)

Os *primers* e as condições de reação descritas por Garcia e Riblet (2001) foram utilizados com algumas modificações (Quadro 3). Cinco microlitros de DNA extraído foram adicionados ao mix de PCR (1x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada *primer* (GES e GEAS), 1,5mM de MgCl₂, 25,25 µL de água ultra-pura esterilizada e 1,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) para uma reação final de 50 µL) e foram submetidos a um ciclo de

95°C/3', 35 ciclos de 94°C/1', 56°C/45'' e 72°C/2', seguidos por 72°C/10' para a extensão final. Dez microlitros do produto da PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 1,5 % corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL e observados sob luz ultravioleta. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram um fragmento de 1870 pb no PCR.

PRIMERS	SEQÜÊNCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
GES	5-GGCTGACCAGGATAGTGAAC-3	1870 pb
GEAS	5-GGTAAGATTTCCCGATTTCTC-3	

Quadro 3 - *Primers* usados para a amplificação do gene E do VLTl.

4.6.2 RFLP de um fragmento do gene E

Vinte microlitros do produto da PCR (1870 pb) obtidos na amplificação da PCR do gene E foram digeridos com a enzima *DdeI*, segundo as recomendações do fabricante por 3 horas a 37°C. O DNA digerido foi analisado em eletroforese em gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídeo 0,5 µg/.

4.6.3 Amplificação de um fragmento do gene da glicoproteína G (G)

Foram utilizados os *primers* e as condições descritas por OLDONI; GARCIA (2007) com algumas modificações (Quadro 4). Cinco microlitros de DNA extraído foram adicionados ao mix de PCR (1x High Fidelity PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada *primer* (UL47gGS e UL47gGAS), 1,5mM de MgSO₄, 25,20 µL de água ultra-pura e 1 U de *Platinum* Taq High Fidelity (Invitrogen™) para uma reação final de 50 µL) e submetidos a um ciclo de 94°C/2', 35 ciclos de 94°C/1', 59°C/45'' e 68°C/3', seguidos por 72°C/10' para extensão final. Dez microlitros do produto da PCR foram analisados em gel de agarose 1,5

% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram um fragmento de 2931 pb na PCR.

PRIMERS	SEQUÊNCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
UL47gGS	5- TCTTGAATGACCTTGCCCCAT-3	2931 pb
UL47gGAS	5- ACTCTCGGGTGGCTACTGCTG-3	

Quadro 4 - *Primers* usados para a amplificação do gene E do VLTl

4.6.4 RFLP de um fragmento do gene G

Vinte microlitros do produto da PCR (2931 pb) obtidos na amplificação da PCR do gene G foi digerido com a enzima *NlaIV*, segundo as recomendações do fabricante por 3 horas a 37°C. O DNA digerido foi analisado em eletroforese em gel de agarose a 1,5 % corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL.

4.6.5 Amplificação de um fragmento do gene da timidina quinase (TK)

Para a caracterização do VLTl, DNA viral foi submetido a um protocolo de *nested*-PCR para a amplificação de um fragmento do gene codificador da timidina quinase (TK). O produto da PCR foi usado para análise por RFLP, sendo o produto da *nested*-PCR foi submetido a seqüenciamento de DNA.

4.6.5.1 Primers

Foram utilizados os *primers* e condições de reação descritas por Han e Kim (2001), com algumas modificações. Como *primers* externos foram utilizados os

iniciadores TKOPS e TKOPAS para a amplificação de um fragmento de 1296 pb do gene TK do VLTl. Como *primers* internos, foram utilizados os *primers* denominados de TKIPS e TKIPAS visando a amplificação de um fragmento de 649 pb a partir do primeiro produto da PCR (Quadro 5).

PRIMERS	SEQUENCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
TKOPS	ATCGTATAGGCCAGCCTT	1296
TKOPAS	CCACGCTCTCTCGAGTAA	
TKIPS	CTTAGCGGAACCTATGCAAG	649
TKIPAS	TAGCGTCTGGTCGATTGAAG	

Quadro 5 - *Primers* usados para a amplificação do gene TK do VLTl.

4.6.5.2 Primeira amplificação

Cinco microlitros de DNA extraído foram adicionados ao mix de PCR (1 x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 pmol/μL de cada *primer* (TKOPS e TKOPAS), 1,5mM de MgCl₂, 25,10 μL de água ultra-pura esterilizada e 1,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) para uma reação final de 50μL) e foram submetidos a um ciclo de 95°C/3', 35 ciclos de 94°C/1', 58°C/90" e 72°C/2', seguidos por 72°C/10' para extensão final.

4.6.5.3 Segunda amplificação (Nested)

Foi realizada adicionando-se 5 μL do produto da primeira amplificação ao mix de PCR (1x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 pmol/μL de cada *primer* (TKIPS e TKIPAS), 1,5mM de MgCl₂, 25,10 μL de água ultra-pura esterilizada e 1,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) para uma reação final

de 50µL) submetidos a 1 ciclo de 95°C/3', 30 ciclos de 94°C/1', 64°C/45'' e 72°C/2', seguidos por 72°C/10' para extensão final.

Dez microlitros do produto da PCR e do *nested* foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 1,5 % corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL e observado sob luz ultra-violeta. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram um fragmento de 1296 pb e 649 pb na PCR e *nested*-PCR respectivamente.

4.6.6 RFLP de um fragmento do gene TK

Vinte microlitros do produto da PCR (1296 pb) obtidos na primeira amplificação da PCR para a timidina quinase (TK) foram digeridos com as enzimas *HaeIII*, *NciI* e *Sau96I* (New England Biolabstm), segundo as recomendações do fabricante por 3 horas a 37°C. O DNA digerido foi analisado em eletroforese em gel de agarose a 1,5 % corado com brometo de etídeo 1,5 µg/mL e observados sob luz ultra-violeta.

4.6.7 Amplificação de um fragmento do gene da proteína reguladora da transcrição (ICP4)

Foram utilizados os *primers* e condições de reação descritas por CHANG et al. (1997), com algumas modificações (Quadro 6). Cinco microlitros de DNA extraído foram adicionados ao mix da PCR (10x PCR Buffer High Fidelity (InvitrogenTM), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada *primer* (ICP4S e ICP4AS), 1,5mM de MgSO₄, 25,20 µL de água ultra-pura esterilizada e 1U de Platinum Taq High Fidelity (InvitrogenTM) para uma reação final de 50µL) e foram submetidos a um ciclo de 95°C/2', 35 ciclos de 94°C/1', 57°C /45'' e 68°C/6', seguidos por 72°C/10' para extensão final. Dez microlitros do produto da PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1,5 % corado com brometo

de etídeo 0,5 µg/mL e observados sob luz ultravioleta. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram um fragmento de 4980 pb na PCR.

PRIMERS	SEQUENCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
ICP4S	5-AACCTGTAGAGACAGTACCGTGACCC- 3	4980 pb
ICP4AS	5-CCATTACTACGTGACCTACATTGAGCC-.	

Quadro 6 - *Primers* usados para a amplificação do gene ICP4 do VLTl

4.6.8 RFLP de um fragmento do gene ICP4

Vinte microlitros do produto da PCR (4.9 kb) obtidos na PCR foram digeridos com as enzimas *HaeIII*, *MspI* e *HinfI* (New England Biolabstm), segundo as recomendações do fabricante por 3 horas a 37⁰C. O DNA digerido foi analisado em eletroforese em gel de agarose a 1,5 % corado com brometo de etídeo 1,5 µg/mL e observados sob luz ultra-violeta.

4.7 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VLTl POR SEQÜENCIAMENTO DE DNA

4.7.1 Amplificação de um fragmento do gene da glicoproteína E

Os produtos obtidos do *nested*-PCR das amostras positivas (item 4.4.3) foram mantidos a -20⁰ C para posterior seqüenciamento.

4.7.2 Amplificação de um fragmento do gene da timidina quinase (TK)

Os produtos da *nested*-PCR obtido no item 4.6.5.3 (fragmento de 649 pb) foram mantidos em temperatura de -20°C para posterior seqüenciamento.

4.7.3 Amplificação de um fragmento do gene da proteína reguladora da transcrição (ICP4)

4.7.3.1 Desenho dos primers

Apartir das seqüências publicadas no Genbank, dois pares de *primers* foram desenhadas para amplificar dois fragmentos de 688 e 631 pb do gene ICP4. Os *primers* desenhados ICP4-1F e ICP4-1R, ICP4-2F e ICP4-2R, localizados respectivamente nas posições 143017 a 143040; 143681 a 143704; 146640 a 146659; e 147253 a 147275 da seqüência completa do VLT1 (Genbank número de acesso NC_006623) foram desenhados após alinhamento das seqüências pelo programa Bioedit v. 5.0.9 (© 1997-2001 Tom Hall) e com o auxílio do software FAST PCR versão 3.3.64 (PCR Team, Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finland). Os *primers* ICP4-1F e ICP4-1R; ICP4-2F e ICP4-2R foram desenhados para amplificar os produtos de 688 e 631 pb, respectivamente (Quadro 7).

Os *primers* foram desenhados a partir de seqüências do gene ICP4 do VLT1 publicadas no Genbank (DQ995291, NC_006623, L32139, EU104899, EU104900, EU104901, EU104902, EU104903, EU104904, EU104905, EU104906, EU104907, EU104908, EU104909, EU104910, EU104911, EU104912, EU104913, EU104914, EU104915, EU104916, EU104917, EU104918, EU104919 e EU104920. Os *primers* foram submetidos a BLAST/n para busca por seqüências não relacionadas às regiões a serem amplificadas.

Nas duas amplificações, a amostra de VLTl isolada e fornecida pelo Laboratório de Referência da Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo foi usada como controle positivo e PBS 0,01 M, pH 7,2 foi usado como controle negativo.

PRIMER	SEQUÊNCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
ICP4-1F	5'-ACTGATAGCTTTTCGTACAGCACG-3'	687 pb
ICP4-1R	5'-CATCGGGACATTCTCCAGGTAGCA-3'	
ICP4-2F	5'-CTTCAGACTCCAGCTCATCTG-3'	631 pb
ICP4-2R	5'-AGTCATGCGTCTATGGCGTTGAC-3'	

Quadro 7 - *Primers* usados para a amplificação de dois fragmentos do gene codificador da proteína ICP4 do VLTl

4.7.3.2 Amplificação

Cinco microlitros (5 µL) de DNA extraído diretamente das amostras clínicas foram adicionados ao PCR *mix* contendo 1x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada *primer* (ICP4-1F e ICP4-1R; ou ICP4-2F e ICP4-2R), 1,5 mM de MgCl₂, 25,25 µL de água ultra-pura e 1,25 U de Taq DNA polimerase, para uma reação final de 50 µL e submetidos a 40 ciclos de 94°C/1', 62°C/1' e 72°C/2', e seguido de 72°C por dez minutos.

4.7.4 Seqüenciamento de DNA

Os fragmentos correspondentes aos genes da glicoproteína E (219 pb), TK (649 pb) e ICP4 (687 e 631 pb) obtidos conforme os itens 4.4.3, 4.6.5.3 e 4.7.3.2 foram purificados dos géis de agarose ou diretamente do tubo de reação de PCR com o *kit* GFX™ (GE), quantificados visualmente com *Low Mass DNA Ladder*

(Invitrogen™) e submetidos ao seqüenciamento de DNA em seqüenciador automático ABI-377 (Applied Biosystems™).

A reação de seqüenciamento consistiu de 4 µL de BigDye 3.1 (Applied Biosystems™), 4 µL de 5x Sequencing buffer (Applied Biosystems™), 4 pmol de cada *primer* senso e antisenso referente a cada gene em reações separadas e 3-10 ng do DNA alvo para uma reação final de 20 µL, levando-se ao termociclador T3 Thermocycles (Biometra®) para 35 ciclos de 96 °C/30 segundos, 50°C/15 segundos e 60°C/4 minutos, com rampa de 0,7°C/segundo entre cada temperatura.

A seguir, o produto desta reação foi precipitado à temperatura ambiente com 80 µL de isopropanol 75%, incubando-se durante 20 minutos, centrifugando-se a 12.000 x g/25', removendo-se o sobrenadante e adicionando-se 250 µL de etanol a 70 %, centrifugando-se a 12.000 x g/5' e secando-se o precipitado a 90°C.

Os cromatogramas gerados para cada uma das seqüências senso e antisenso de cada amostra foram conferidos com o programa Chromas v. 2.33 (© 1998-2007 Technelysium Pty LTD) para a busca por erros de interpretação e discrepâncias entre cada uma das fitas seqüenciadas. A seqüência consenso final de cada amostra foi obtida a partir das seqüências senso e o reverso-complemento das seqüências anti-senso de cada amostra alinhadas com o programa Bioedit v. 7.0.9 (© 1997-2007 Tom Hall), sendo a mesma submetida ao BLASTn para confirmação do seqüenciamento.

As seqüências geradas foram utilizadas para geração de árvores filogenéticas, juntamente com seqüências homólogas recuperadas do GenBank, utilizando-se o critério de otimização de distância, como algoritmo Neighbor-Joining e modelo de substituição Kimurn-2 parâmetros e 1000 repetições de bootstrap com o programa MEGA 4.1 (KUMAR et al., 2001).

5 RESULTADOS

5.1 DETECÇÃO DO VLTÍ POR PCR

A técnica de *nested*-PCR padronizada mostrou-se eficiente para a detecção do VLTÍ a partir de tecido de material de campo, de amostras isoladas em embrião de galinha e de amostras vacinais. A técnica de *nested*-PCR gerou, nos casos positivos, um produto do tamanho esperado (219 pb) (Figura 2).

Setenta e duas amostras foram diagnosticadas positivas para o VLTÍ através da técnica de PCR utilizada como triagem. O número de casos positivos diminuiu após a liberação do uso das vacinas atenuadas na região de Bastos (Quadro 8).

Data de coleta (Ano)	Data de processamento	Amostras testadas	Amostras positivas	Amostras positivas (%)
2002	2005	6	4	66.67
2003	2005	51	24	47.06
2004	2006	87	21	24.14
2005	2006	28	4	14.28
2006	2006	20	1	5
2007	2007	92	12	13.04
2008	2008	147	6	4.08
TOTAL		431	72	16.70

Quadro 8 - Amostras testadas e diagnosticadas positivas para o VLTÍ através da PCR no Laboratório de Ornitopatologia (FMVZ-USP).

O VLTÍ foi detectado principalmente em aves de postura comercial (84.61% dos casos positivos). Em 64 dos 72 casos positivos (88.9%), o VLTÍ foi detectado em amostras procedentes da região de Bastos, onde aconteceu o surto clínico da doença e onde desde o dia primeiro de fevereiro de 2004, a vacinação compulsória com vacinas atenuadas vem sendo realizada. O quadro 9 mostra as amostras detectadas positivas para LTI.

AMOSTRA	ANO DETECÇÃO	ORIGEM ISOLADO	TIPO DE AVE	USO DE VACINA
LTI-1	2002	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-2	2002	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-3	2002	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-4	2002	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-5	2003	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-6	2003	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-7	2003	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-8	2003	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-9	2003	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-10	2003	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-11	2003	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-12	2003	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-13	2003	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-14	2003	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-15	2003	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-16	2003	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-17	2003	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-18	2003	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-19	2003	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-20	2003	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-21	2003	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-22	2003	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-23	2003	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-24	2003	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-25	2003	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-26	2003	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-27	2003	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-28	2003	Bastos/SP	Poedeira	Não
LTI-29	2004	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-30	2004	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-31	2004	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-32	2004	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-33	2004	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-34	2004	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-35	2004	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-36	2004	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-37	2004	Bastos/SP	Poedeira	Sim

Quadro 9 - Ano de detecção, procedência, tipo de ave e uso de vacina das amostras positivas para LTI por PCR.

Continua...

AMOSTRA	ANO DETECÇÃO	ORIGEM DO ISOLADO	TIPO DE AVE	USO DE VACINA
LTI-38	2004	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-39	2004	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-40	2004	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-41	2004	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-42	2004	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-43	2004	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-44	2004	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-45	2004	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-46	2004	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-47	2004	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-48	2004	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-49	2004	MG	Matriz	Não
LTI-50	2005	Não informado	Não informado	Não
LTI-51	2005	Não informado	Não informado	Não
LTI-52	2005	Guatapar/SP	Matriz	Não
LTI-53	2005	Guatapar/SP	Matriz	Não
LTI-54	2006	Barretos/SP	Poedeira	Não
LTI-55	2007	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-56	2007	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-57	2007	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-58	2007	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-59	2007	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-60	2007	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-61	2007	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-62	2007	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-63	2007	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-64	2007	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-65	2007	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-66	2007	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-67	2008	Não informado	Não informado	Não
LTI-68	2008	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-69	2008	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-70	2008	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-71	2008	Bastos/SP	Poedeira	Sim
LTI-72	2008	Bastos/SP	Poedeira	Sim

Quadro 9 - Ano de detecção, procedência, tipo de ave e uso de vacina das amostras positivas para LTI por PCR.

Com a técnica de PCR utilizada para a triagem, foi possível detectar o vírus principalmente em traquéia, mas também em conjuntiva, gânglio trigêmeo e suabe de traquéia. A detecção ocorreu em aves com e sem sinais clínicos da doença. O VLTi foi detectado principalmente em “pool” de traquéia e conjuntiva (87.84 % dos casos positivos). De outro lado, o VLTi foi detectado em traquéia, conjuntiva e gânglio trigêmeo, órgão onde o VLTi faz latência, em aves que não apresentavam sinais clínicos, sugerindo que o VLTi pode fazer latência também nestes órgãos (Quadro 10).

ÓRGÃO	TRAQUÉIA E CONJUNTIVA	GÂGLIO TRIGÊMEO	TRAQUEIA, CONJUNTIVA e GÂGLIO TRIGÊMEO	SUABE DE TRAQUÉIA
Presença de sinais clínicos	22/24 casos positivos	1/1 caso positivo	1/3 casos positivos	6/6 casos positivos
Ausência de sinais clínicos	38/43 casos positivos	8/ casos positivos	4/37 casos positivos	--

Quadro 10 - Detecção do VLTi por órgão e pela presença ou ausência de sinais clínicos suspeitos da doença

5.2 ISOLAMENTO DO VLTi

O isolamento do VLTi foi realizado segundo o protocolo convencional, o qual é citado na literatura. Lesões nos embriões, como hemorragia e presença de placas tipo “pox” característicos do vírus foram observadas principalmente depois da quarta passagem em ovos embrionados. As amostras vacinais produzidas em embriões de galinha SPF (CEO), provocaram lesões mais evidentes na MCA (Figura 2, 3, 4 e 5).

Figura 2 - Isolamento do VLTi em ovos embrionados SPF após inoculação pela MCA. Amostra de campo LTI-5

Figura 3 - Isolamento do VLTi em ovos embrionados SPF após inoculação pela MCA. Cepa TCO (LT-IVAX)

Figura 4 - Isolamento do VLTi em ovos embrionados SPF após inoculação pela MCA. Cepa CEO (Novilis ILT)

Figura 5 - Isolamento do VLTi em ovos embrionados SPF após inoculação pela MCA. Cepa CEO (Laryngo-Vac)

5.3 AMPLIFICAÇÃO DE UM FRAGMENTO DO GENE DA GLICOPROTEÍNA E

A reação de PCR conseguiu amplificar o DNA correspondente a um fragmento de 1870 pb do gene E do VLTl a partir de amostras vacinais e de campo (Figura 6).

Figura 6 - PCR do gene E de estirpes vacinais do VLTl. 1: Cepa TCO (LT-IVAX), 2: Cepa CEO (Laryngo-Vac), 3: Cepa CEO (Nobilis ILT), 4: Controle negativo e 5: Marcador molecular (1 kb)

5.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VLTl POR PCR-RFLP DE UMA REGIÃO DO GENE E

O produto de PCR que amplificou uma região do gene E (1870 pb) de 43 amostras de campo e de três amostras vacinais foi digerido com a enzima *Ddel*. Três padrões de restrição foram observados. Trinta e oito amostras de campo e a cepa CEO (Laryngo-Vac) apresentaram o padrão A, a cepa TCO apresentou o padrão B, a cepa CEO (Nobilis ILT) e 5 amostras de campo tiveram o padrão C (Figura 7).

Figura 7 - PCR-RFLP de produtos do gene E digeridos com *DdeI*. 1: LTI-1, 2: TCO (LT-IVAX), 3: CEO (Laryngo-Vac) 4: CEO (Nobilis ILT), 5: LTI-47, 6: Controle negativo e 7: Marcador molecular (100 pb)

5.5 AMPLIFICAÇÃO DE UM FRAGMENTO DO GENE DA GLICOPROTEÍNA G

Os *primers* UL47/gGS e UL47/gGAS e as condições descritas conseguiram amplificar DNA do gene G do VLTI das três amostras vacinais e das amostras de campo, no tamanho próximo ao esperado (2931 pb) (Figura 8).

Figura 8 - PCR do gene G de estirpes campo e vacinais do VLTI. 1: Marcador molecular (1 kb). 2: LTI-1, 3: Cepa TCO (LT-IVAX), 4: Cepa CEO (Laryngo-Vac) e 5: Controle negativo

5.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VLTl POR PCR-RFLP DE UMA REGIÃO DO GENE G

O produto amplificado usando os *primers* UL47/gGS e UL47/gGAS foi submetido à digestão com *Nla*IV (Figura 9). Os padrões de digestão resultantes não conseguiram diferenciar entre os dois tipos de vacinas. Dois padrões foram observados: o padrão A incluiu 31 amostras de campo, enquanto que o padrão B agrupou as cepas vacinais (TCO e CEO) e 12 amostras de campo.

Figura 9 - PCR-RFLP de produtos do gene G digeridos com *Nla*IV. 1: Marcador molecular (100 pb), 2: LTI-1, 3: LTI-7, 4: TCO (LT-IVAX), 5: CEO (Laryngo-Vac), 6: CEO (Nobilis ILT) e 7: Controle negativo.

5.7 AMPLIFICAÇÃO DE UM FRAGMENTO DO GENE DA TIMIDINA QUINASE (TK)

Os *primers* TKOPS e TKOAS e as condições descritas, conseguiram amplificar o DNA do gene TK do VLTl das três amostras vacinais e das amostras de campo, no tamanho próximo ao esperado (1296 pb).

5.8 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VLTl POR PCR – RFLP DE UMA REGIÃO DO GENE TK

5.8.1 Enzima *HaeIII*

Quando o produto da PCR que do gene TK de 43 amostras de campo e das três amostras vacinais foi digerido com *HaeIII*, dois padrões foram observados (Figura 10). Trinta e uma amostras de campo apresentaram o padrão A, enquanto que as doze amostras de campo e as cepas TCO e CEO mostraram o padrão B.

Figura 10 - PCR-RFLP dos produtos do gene TK do VLTl digeridos com *HaeIII*. 1: LTI-1, 2: LTI-27, 3: TCO (LT-IVAX), 4: CEO (Laryngo-Vac), 5: CEO (Nobilis ILT), 6: Controle negativo e 7: Marcador molecular (100 pb)

5.8.2 Enzima *NciI*

Depois da digestão com a enzima *NciI* do produto da PCR que amplificou uma região do gene TK (1296 pb) de 43 amostras de campo e das três amostras

vacinais, dois padrões de restrição foram observados. Trinta e uma amostras de campo mostraram o padrão A, enquanto que as 12 amostras de campo e as três cepas vacinais apresentaram o padrão B (Figura 11).

Figura 11 - PCR-RFLP dos produtos do gene TK do VLT1 digeridos com *NciI*. 1: LTI-1, 2: LTI-27, 3: TCO (LT-IVAX), 4: CEO (Laryngo-Vac), 5: CEO (Nobilis ILT), 6: Controle negativo e 7: Marcador molecular (100 pb)

5.8.3 Enzima *Sau96I*

Dois padrões de restrição foram observados quando o produto da PCR do gene TK de 43 amostras clínicas e das três amostras vacinais foi digerido com *Sau96I*. Trinta e uma amostras de campo apresentaram o padrão A, enquanto que doze amostras de campo e as vacinas TCO e CEO apresentaram o padrão B (Figura 12).

Figura 12 - PCR-RFLP dos produtos do gene TK do VLTl digeridos com *Sau96I*. 1: LTI-1, 2: LTI-27, 3: TCO (LT-IVAX), 4: CEO (Laryngo-Vac), 5: CEO (Nobilis ILT), 6: Controle negativo e 7: Marcador molecular (100 pb)

5.9 AMPLIFICAÇÃO DE UM FRAGMENTO DO GENE DA PROTEÍNA REGULADORA DA TRANSCRIÇÃO (ICP4)

Foram amplificadas amostras de campo e cepas vacinais usando os *primers* ICP4S e ICP4AS (Figura 13).

Figura 13 - PCR do gene ICP4 de estirpes vacinais do VLTl. 1. Marcador molecular de 1kb. 2: LTI-1, 3: Cepa TCO (LT-IVAX), 4: Cepa CEO (Nobilis ILT) e 5: Controle negativo

5.10 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VLTl POR PCR – RFLP DE UMA REGIÃO DO GENE ICP4

5.10.1 Enzima *HaeIII*

Dois padrões de restrição foram observados após a digestão com *HaeIII* do produto da PCR do gene ICP4 (4980 pb) de 20 amostras de campo e de três amostras vacinais (Figura 14). As amostras de campo, com exceção de LTI-7 e LTI-27 apresentaram o padrão A, enquanto as amostras LTI-7 e LTI-27 e as cepas vacinais mostraram o padrão B (Figura 14).

Figura 14 - PCR-RFLP dos produtos do gene ICP4 do VLTl digeridos com *HaeIII*. 1: Marcador molecular (100 pb). 2: LTI-1, 3: LTI-7, 4: TCO (LT- IVAX), 5: CEO (Laryngo-Vac) e 6: CEO (Nobilis ILT)

5.10.2 Enzima *MspI*

O produto da PCR de 4.9 kp do gene ICP4 de 20 amostras de campo e das três vacinais foi digerido com *MspI*, três padrões foram observados. Dezoito

amostras de campo apresentaram o padrão A, as amostras LTI-7, LTI-27 e as duas cepas CEO tiveram o padrão B. O padrão C incluiu a cepa TCO (Figura 15).

Figura 15 - PCR-RFLP dos produtos do gene ICP4 do VLT1 digeridos com *MspI*. 1: Marcador molecular (100 pb). 2: LTI-1, 3: LTI-27, 4: TCO (LT-IVAX), 5: CEO (Laryngo-Vac) e 6: CEO (Nobilis ILT)

5.10.3 Enzima *Hinp*1I

O produto da PCR do ICP4 (4.9 kb) de 20 amostras de campo e das três vacinas foi digerido com *Hinp*1I. Três padrões foram observados. Dezoito amostras de campo apresentaram o padrão A, os isolados LTI-7 e LTI-27, e as cepas CEO apresentaram o padrão B, e a cepa TCO mostrou o padrão C (Fig 16).

Figura 16 - PCR-RFLP dos produtos do gene ICP4 do VLT1 digeridos com *Hinp*1I. 1: Marcador molecular (100 pb). 2: LTI-1, 3: LTI-27, 4: TCO (LT-IVAX), 5: CEO (Laryngo-Vac) e 6: CEO (Nobilis ILT)

5.11 COMBINAÇÃO DE PADRÕES DE RESTRIÇÃO OBTIDOS APÓS A DIGESTÃO DOS PRODUTOS DE PCR DO VLTl

O quadro 11 mostra a combinação de padrões de restrição obtidos após a digestão dos produtos de PCR de quatro genes do VLTl.

Amostra Cepa	Gene								Grupo
	gE	gG	TK			ICP4			
	<i>Ddel</i>	<i>NladIV</i>	<i>HaeIII</i>	<i>NciI</i>	<i>Sau96I</i>	<i>HaeIII</i>	<i>MspI</i>	<i>Hinp1I</i>	
LTI-1	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-2	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-3	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-4	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-6	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-7	B	B	B	B	B	B	B	B	II
LTI-9	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-8	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-9	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-11	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-12	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-13	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-15	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-16	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-17	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-18	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-19	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-20	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-22	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-25	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-26	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-27	B	B	B	B	B	B	B	B	II
LTI-29	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-32	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-38	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-39	A	A	A	A	A	A	A	A	I

Quadro 11 – Comparação dos padrões gerados por PCR-RFLP de quatro genes de isolados de campo e cepas vacinais do VLTl

Tabela formatada

Continua...

Amostra Cepa	GENE								Grupo
	gE	gG	TK			ICP4			
	Ddel	NlaIV	HaeIII	NciI	Sau96I	HaeIII	MspI	HinfI	
LTI-41	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-44	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-45	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-47	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-49	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-50	A	B	B	B	B	B	B	B	II
LTI-51	A	B	B	B	B	B	B	B	II
LTI-52	C	B	B	B	B	B	C	B	IV
LTI-53	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-54	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-55	C	B	B	B	B	B	C	B	IV
LTI-57	C	B	B	B	B	B	C	B	IV
LTI-58	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-59	A/C	B/B	B/B	B/B	B/B	B/B	B/C	B/C	II e IV
LTI-62	A	B	B	B	B	B	B	B	II
LTI-64	C	B	B	B	B	B	C	B	IV
LTI-65	A/C	B/B	B/B	B/B	B/B	B/B	B/C	B/C	II e IV
LTI-66	A	B	B	B	B	B	B	B	II
LTI-67	A	A	A	A	A	A	A	A	I
LTI-68	A	A	A	A	A	A	A	A	I
TCO	B	B	B	B	B	B	C	C	III
CEO									
Laryngo	A	B	B	B	B	B	B	B	II
CEO									
NobilisLT	C	B	B	B	B	B	C	B	IV

Quadro 11 – Comparação dos padrões gerados por PCR-RFLP de quatro genes de isolados de campo e cepas vacinais do VLT1

5.12 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VLTl POR SEQÜENCIAMENTO DE UMA REGIÃO DO GENE DA GLICOPROTEÍNA E

Foram seqüenciadas oito amostras do VLTl, incluindo cinco amostras de campo e as três vacinas atenuadas usadas no Brasil. O seqüenciamento de DNA do produto do *nested*-PCR do gene E resultou em seqüências de 171 a 177 nucleotídeos. Quando submetidas ao BLASTn as seqüências resultaram apenas em seqüências derivadas do VLTl, sem outras de escore significativo. As seqüências obtidas foram depositadas no Genbank (Quadro 12).

AMOSTRA	DATA DA DETECÇÃO	NOME DA SEQÜÊNCIA	NÚMERO DE ACESSO (GENBANK)
Cepa TCO	2007	LT-IVAX	EU076288
Cepa CEO	2007	LARYNGO-VAC	EU076289
Cepa CEO	2007	NOBILIS ILT	EU076290
LTI-1	2002	ILTV/BRAZIL-01	EU076286
LTI-2	2002	ILTV/BRAZIL-02	EU076287
LTI-5	2003	ILTV/BRAZIL-03/	DQ 223072
LTI-20	2003	ILTV/BRAZIL-20	EU076284
LTI-26	2003	ILTV/BRAZIL-26	EU076285

Quadro 12 - Amostras seqüenciadas para uma região do gene codificador da glicoproteína E do VLTl publicadas no Genbank.

As seqüências do gene E do VLTl obtida por seqüenciamento foram utilizadas para confirmação de identidade por alinhamento e comparação com três seqüências do gene E do VLTl publicadas no Genbank. As seqüências foram alinhadas com o programa Bioedit v. 5.0.9 (Figura 17).

Figura 17 - Alinhamento de nucleotídeos de um segmento do gene codificador da glicoproteína E (gE) do VLT1

Quando calculada a porcentagem de identidade de nucleotídeos para a região de alinhamento, a mesma foi de 89,5 a 100% entre os isolados brasileiros e as cepas vacinais. Estes mesmos valores foram observados quando comparadas com isolados de outros países (Tabela 1).

Amostras	LTI-01	LTI-02	LTI-05	LTI-20	LTI-26	Xingy	Chang	28832	LT-IVAX	Laryng Vac	Nobilis
LTI-01	ID	0.994	0.895	0.994	0.994	1	1	1	1	1	1
LTI-02	0.994	ID	0.889	1	1	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994
LTI-05	0.895	0.889	ID	0.889	0.889	0.895	0.895	0.895	0.895	0.895	0.895
LTI-20	0.994	1	0.889	ID	1	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994
LTI-26	0.994	1	0.889	1	ID	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994
Xingyang	1	0.994	0.895	0.994	0.994	ID	1	1	1	1	1
Changge	1	0.994	0.895	0.994	0.994	1	ID	1	1	1	1
ILU28832	1	0.994	0.895	0.994	0.994	1	1	ID	1	1	1
LT-IVAX	1	0.994	0.895	0.994	0.994	1	1	1	ID	1	1
Laryngo-vac	1	0.994	0.895	0.994	0.994	1	1	1	1	ID	1
Nobilis ILT	1	0.994	0.895	0.994	0.994	1	1	1	1	1	ID

Tabela 1 - Cálculo de identidade de nucleotídeos de diversas seqüências do gene E do VLTl

As seqüências obtidas pelo seqüenciamento do gene E foram utilizadas para a construção de uma árvore filogenética (Figura 18). Pode-se observar que não foi possível diferenciar e nem mostrar qualquer tipo de relação entre as amostras seqüenciadas. Por esta razão, nenhuma outra amostra foi seqüenciada para este gene.

Figura 18 - Árvore filogenética baseada em seqüências correspondentes ao gene E do VLTl

5.13 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VLTI POR SEQUENCIAMENTO DE UMA REGIÃO DO GENE TK

Vinte e quatro amostras, sendo vinte e uma amostras isoladas de campo e três cepas vacinais, foram seqüenciadas. O seqüenciamento de DNA do produto do *nested*-PCR destas amostras resultou em seqüências entre 605 e 609 nucleotídeos. Quando submetidas ao BLASTn estas resultaram apenas em seqüências derivadas do VLTI, sem outras seqüências de escore significativo. As seqüências obtidas foram depositadas no Genbank (Quadro 13).

As seqüências de 605 a 609 pb do gene que codifica um fragmento do gene TK do VLTI obtidas por seqüenciamento, foram utilizadas para análise filogenética mediante comparação com outras seqüências do mesmo gene publicados no Genbank. As seqüências foram alinhadas com o programa Bioedit v. 5.0.9 (Figura 19). O seqüenciamento deste fragmento do gene TK permitiu diferenciar entre cepas de alta e baixa virulência. As cepas vacinais e as amostras LTI-27, LTI-55, LTI-57, LTI-59, LTI-62, LTI-65 e LTI-66 apresentaram o aminoácido treonina na posição 252 do gene, enquanto que as outras amostras isoladas de campo tiveram o aminoácido metionina na mesma posição. A análise de aminoácidos permitiu diferenciar entre as amostras vacinais e amostras de campo, mas não foi possível discriminar entre os dois tipos de vacinas atenuadas (Figura 19).

AMOSTRA	DATA DE COLETA DAS AMOSTRAS	AMINOACIDO NA POSIÇÃO 252	NÚMERO DE ACESSO (GENBANK)
TCO (LT-IVAX)	2007	Treonina	FJ444832
CEO (LaryngoVac)	2007	Treonina	FJ444830
CEO (Nobilis ILT)	2007	Treonina	FJ444831
LTI-1	2002	Metionina	FJ444832
LTI-2	2002	Metionina	FJ444833
LTI-6	2003	Metionina	FJ444834
LTI-9	2003	Metionina	FJ444835
LTI-22	2003	Metionina	
LTI-26	2003	Metionina	DQ786400
LTI-27	2003	Treonina	
LTI-29	2004	Metionina	DQ786401
LTI-32	2004	Metionina	FJ444836
LTI-38	2004	Metionina	FJ444837
LTI-39	2004	Metionina	FJ444838
LTI-41	2004	Metionina	FJ444839
LTI-44	2004	Metionina	FJ444840
LTI-45	2004	Metionina	FJ444841
LTI-47	2004	Metionina	FJ444842
LTI-55	2007	Treonina	FJ444843
LTI-57	2007	Treonina	FJ444844
LTI-59	2007	Treonina	FJ444845
LTI-62	2007	Treonina	FJ444846
LTI-65	2007	Treonina	FJ444847
LTI-66	2007	Treonina	FJ444848

Quadro 13 - Amostras seqüenciadas e resultados do seqüenciamento de uma região do gene timidina quinase de isolados de campo e cepas vacinais do VLT

Figura 19 - Alinhamento e comparação de aminoácidos de um fragmento do gene TK de amostras de campo e cepas vacinais do VLT1

Sete amostras foram indistinguíveis das estirpes CEO (100% de identidade na sequência de nucleotídeos do gene TK. Uma delas foi isolada durante o surto epidêmico na região de Bastos, enquanto que seis amostras foram detectadas depois do uso das vacinas vivas na mesma região. As sequências das amostras de campo restantes mostraram entre 99.8 a 100% de identidade entre si, e de 99.3 a 99.6 % de identidade com as cepas vacinais. Quando comparada as amostras brasileiras com outras sequências publicadas no Genbank, observou-se entre 98.8 a 99.6 % de identidade (Tabela 2).

AMOSTRA	TCO	CEO-1	CEO-2	Yantai	ILACP	CG	Samberg	XY	Beijing E2	U.S. 632	216	LTI 1	LTI 27	LTI 66
LTI-IVAX (TCO)	ID	0.998	0.998	0.991	0.991	0.998	0.998	0.996	0.991	0.998	0.991	0.995	0.998	0.998
Laryngo-vac (CEO)	0.998	ID	1	0.993	0.993	1	1	0.998	0.993	1	0.993	0.996	1	1
Nobilis ILT (CEO)	0.998	1	ID	0.993	0.993	1	1	0.998	0.993	1	0.993	0.996	1	1
Yantai	0.991	0.993	0.993	ID	0.986	0.993	0.993	0.991	0.986	0.993	0.986	0.99	0.993	0.993
ILACPTK	0.991	0.993	0.993	0.986	ID	0.993	0.993	0.991	1	0.993	1	0.99	0.993	0.993
CG	0.998	1	1	0.993	0.993	ID	1	0.998	0.993	1	0.993	0.996	1	1
Samberg	0.998	1	1	0.993	0.993	1	ID	0.998	0.993	1	0.993	0.996	1	1
XY	0.996	0.998	0.998	0.991	0.991	0.998	0.998	ID	0.991	0.998	0.991	0.995	0.998	0.998
Beijing	0.991	0.993	0.993	0.986	1	0.993	0.993	0.991	ID	0.993	1	0.99	0.993	0.993
U.S. 632	0.998	1	1	0.993	0.993	1	1	0.998	0.993	ID	0.993	0.996	1	1
216	0.991	0.993	0.993	0.986	1	0.993	0.993	0.991	1	0.993	ID	0.99	0.993	0.993
LTI-1	0.995	0.996	0.996	0.99	0.99	0.996	0.996	0.995	0.99	0.996	0.99	ID	0.996	0.996
LTI-27	0.998	1	1	0.993	0.993	1	1	0.998	0.993	1	0.993	0.996	ID	1
LTI-66	0.998	1	1	0.993	0.993	1	1	0.998	0.993	1	0.993	0.996	1	ID

Tabela 2 - Cálculo de identidade de nucleotídeos de sequências do gene TK correspondentes a isolados de campo e cepas vacinais do VLT1

Foi construída uma árvore filogenética com as sequências brasileiras geradas neste trabalho e as obtidas do Genbank. A árvore agrupou as amostras isoladas no Brasil em um único ramo, separado das amostras vacinais e das isoladas em outras partes do mundo (Figura 20). Seis amostras detectadas no Estado de São Paulo foram mais próximas das cepas vacinais CEO.

Figura 20 - Árvore filogenética construída com as seqüências de nucleotídeos do gene TK de amostras de campo e cepas vacinais

5.14 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VLTI POR SEQUÊNCIAMENTO DE UMA REGIÃO DO GENE ICP4

Os pares de *primers* ICP4-1F - ICP4-1R e ICP4-2F - ICP4-2R conseguiram amplificar dois fragmentos do gene ICP4 do VLTI das três amostras vacinais e das amostras de campo, no tamanho próximo ao esperado (Figuras 21 e 22).

Figura 21 – PCR de um fragmento do gene ICP4 usando os *primers* ICP41F e ICP41R. 1 : Amostra de campo, 2: Cepa TCO, 3: Cepa CEO, 4: Controle negativo e 5: Marcador molecular (100 pb)

Figura 22 – PCR de um fragmento do gene ICP4 usando os *primers* ICP42F e ICP42R. 1: Marcador molecular (100 pb), 2: Amostra de campo, 3: Cepa TCO, 4: Cepa CEO e 5: Controle negativo.

Trinta e nove amostras foram caracterizadas por seqüenciamento do gene ICP4 (trinta e seis isoladas de campo e as três cepas vacinais utilizadas no Brasil). Foram seqüenciadas vinte e nove amostras, amplificadas com os *primers* ICP4-1F e ICP4-1R, e vinte e quatro usando os *primers* ICP4-2F e ICP4-2R (Quadro 14). O seqüenciamento resultou em seqüências de 618 a 640 e 586 a 588 nucleotídeos usando os *primers* ICP4-1F e ICP4-1R, e ICP4-2F e ICP4-2R, respectivamente. Quando submetidas ao BLASTn, estas seqüências resultaram apenas em seqüências derivada do VLTi, sem outras seqüências de escore significativo. As seqüências obtidas foram depositadas no Genbank (Quadro 14).

As seqüências de 618 a 640 e 586 a 588 pb foram utilizadas para análise filogenética mediante comparação com outras seqüências publicadas no Genbank. As seqüências foram alinhadas com Bioedit v. 7.0.9 (Figuras 23 e 24).

O seqüenciamento do fragmento localizado entre os nucleotídeos 143017 e 143704 do genoma viral permitiu diferenciar a cepa selvagem isolada originalmente na região de Bastos da cepa TCO e das duas cepas CEO. Os isolados de campo caracterizados neste estudo e a cepa TCO diferiram das cepas CEO pela presença de quatro aminoácidos adicionais (alanina-alanina-glicina-ácido aspártico) (Figura 23). A análise desta região também permitiu diferenciar entre as duas cepas CEO, através da análise de nucleotídeos (a cepa Laryngo-Vac apresentou guanina na posição 480 da seqüência amplificada, enquanto que a cepa CEO Nobilis ILT apresentou adenina na mesma posição). Após a liberação da vacinação na região de Bastos, amostras com seqüência de aminoácidos idênticos às cepas CEO foram encontradas. As seqüências das amostras LTI-7, LTI-27, LTI-50 e LTI-51 mostraram ser idênticas à cepa CEO Laryngo-Vac, já as amostras LTI-52, LTI-57, LTI-59, LTI-64 e LTI-65 foram idênticas à amostra CEO Nobilis ILT. A maioria de isolados detectados durante o surto da doença na região de Bastos foram idênticas entre elas, mas diferentes das amostras isoladas em outros países e das cepas vacinais. As amostras LTI-53 e LTI-54, isoladas de quadros clínicos da doença no ano de 2005 e 2006, em granjas localizadas fora da região de Bastos, foram diferentes das cepas vacinais, e da cepa selvagem de Bastos pela ausência dos aminoácidos leucina-fenilalanina-leucina na posição 178-180 da região seqüenciada (Figura 23).

AMOSTRA	DATA COLETA DAS AMOSTRAS	TIPIFICAÇÃO POR ANÁLISE DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS		NÚMERO DE ACESSO (GENBANK)
		Usando <i>primers</i> ICP41F-ICP4-1R	Usando <i>primers</i> ICP42F-ICP4-2R	
TCO	2007	TCO	TCO	FJ477349
CEO LaryngoVac	2007	CEO 1	CEO 1	FJ477350
CEO (Nobilis ILT)	2007	CEO 2	CEO 2	FJ477351
LTI-1	2002	campo 1	campo 1	FJ477352
LTI-2	2002	campo 1	campo 1	FJ477353
LTI-3	2002	campo 1	campo 1	FJ477354
LTI-4	2002	campo 1	campo 1	FJ477355
LTI-6	2003	campo 1	campo 1	FJ477356
LTI-7	2003	CEO 1	CEO 1	
LTI-9	2003	campo 1	campo 1	FJ477357
LTI-12	2003	campo 1	campo 1	FJ477358
LTI-13	2003	campo 1	campo 1	FJ477359
LTI-15	2003	campo 1		
LTI-16	2003	campo 1		
LTI-17	2003	campo 1		
LTI-18	2003	campo 1		
LTI-19	2003	campo 1	campo 1	FJ477360
LTI-20	2003	campo 1	campo 1	FJ477361
LTI-22	2003	campo 1	campo 1	FJ477362
LTI-25	2003	campo 1	campo 1	FJ477363
LTI-26	2003	campo 1	campo 1	FJ477364
LTI-27	2003	CEO 1	CEO 1	FJ477365
LTI-29	2004	campo 1		FJ477366
LTI-38	2004		campo 1	FJ477367
LTI-39	2004		campo 1	FJ477368
LTI-41	2004		campo 1	FJ477369
LTI-44	2004		campo 1	FJ477370
LTI-47	2004		campo 1	FJ477371
LTI-49	2004	campo 1		
LTI-50	2005	CEO 1		FJ477372*

Tabela formatada

Quadro 14 - Amostras seqüenciadas e resultados do seqüenciamento de duas regiões do gene ICP4 de isolados de campo e cepas vacinais do VLTl

Continua...

AMOSTRA	DATA COLETA DAS AMOSTRAS	TIPIFICAÇÃO POR ANÁLISE DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS		NÚMERO DE ACESSO (GENBNK)
		Usando <i>primers</i> ICP41F-ICP4-1R	Usando <i>primers</i> ICP42F-ICP4-2R	
LTI-51	2005	CEO 1		FJ477373
LTI-52	2005	CEO 2		FJ477374
LTI-53	2005	campo 2		
LTI-54	2006	campo 2		
LTI-57	2007	CEO 2	CEO 2	FJ477375
LTI-58	2007		campo 1	
LTI-59	2007	CEO 2	CEO 1	FJ477376
LTI-62	2007		CEO 1	FJ477377
LTI-64	2007	CEO 2		FJ477378
LTI-65	2007	CEO 2	CEO 1	FJ477379
LTI-67	2008	campo 1	campo 1	FJ477380
LTI-68	2008	campo 1	campo 1	

Quadro 14 - Amostras seqüenciadas e resultados do seqüenciamento de duas regiões do gene ICP4 de isolados de campo e cepas vacinais do VLTl

Análise de aminoácidos das seqüências localizadas entre os nucleotídeos 146640 e 147275 (gene ICP4) permitiu diferenciar as cepas selvagens das cepas TCO e CEO. As amostras de campo e as cepas CEO apresentaram serina-ácido glutâmico nas posições 63 e 172 da seqüência analisada, enquanto que a cepa TCO apresentou treonina-glicina nas mesmas posições. Além disso, também foi possível diferenciar entre os isolados de campo e as cepas CEO (as amostras de campo apresentaram prolina na posição 27 da seqüência analisada, já as cepas CEO apresentaram leucina). A análise de nucleotídeos e aminoácidos nesta região mostrou que as amostras LTI-27, LTI-59 e LTI-62 eram diferentes da cepa TCO e da estirpe Nobilis ILT, mas são indistinguíveis da CEO Laryngo-Vac (Figura 24). Similar ao observado com a região compreendida entre os nucleotídeos 143017 e 143704 do genoma viral, nesta região a maioria das amostras isoladas durante o surto em Bastos mostraram-se idênticas entre si, mas diferentes das amostras isoladas em outros países, e inclusive das amostras TCO e CEO.

Figura 23 - Alinhamento de aminoácidos de um segmento do gene ICP4 (localizados entre os nucleotídeos 143017 e 143704 do VLT1)

Figura 24 - Alinhamento de aminoácidos de um segmento do gene ICP4 (localizados entre os nucleotídeos 146640 e 147275 do VLT1)

Quando calculado o grau de identidade entre as seqüências de nucleotídeos da região compreendida entre os nucleotídeos 143017 e 143704 do genoma do VLTI, observou-se que oito amostras brasileiras eram indistinguíveis das cepas CEO, sendo duas delas detectadas antes da liberação da vacinação em Bastos. As outras amostras brasileiras isoladas de Bastos antes da liberação da vacina naquela região mostraram ser idênticas entre elas (100% de identidade) e diferentes dos isolados de outros países e das cepas vacinas (97 a 99.8 e 97.3 a 99.8% de identidade, respectivamente). Amostras detectadas após a liberação da vacina mostraram entre 97.5 a 100% de identidade com as amostras selvagens isoladas durante o surto inicial da doença em Bastos (Tabela 3).

Seq->	TCO	CEO	LT- IVAX	Laryngo- vac	Nobilis ILT	LTI-1	LTI- 27	LTI- 49	LTI- 50	LTI- 53	LTI- 54	LTI- 57	LTI- 65	LTI- 68
EU10490TCO	ID	0.977	1	0.975	0.977	0.998	0.975	0.996	0.975	0.982	0.982	0.977	0.977	0.998
EU10490CEO	0.977	ID	0.977	0.998	1	0.975	0.998	0.973	0.998	0.959	0.959	1	1	0.975
501/C/06/BR	0.977	1	0.977	0.998	1	0.975	0.998	0.973	0.998	0.959	0.959	1	1	0.975
205/J/06/BR	0.977	1	0.977	0.998	1	0.975	0.998	0.973	0.998	0.959	0.959	1	1	0.975
20/F/04/BR	0.996	0.98	0.996	0.978	0.98	0.995	0.978	0.993	0.978	0.978	0.978	0.98	0.98	0.995
12/D/02/BCK	0.995	0.972	0.995	0.97	0.972	0.996	0.97	0.995	0.97	0.98	0.98	0.972	0.972	0.996
24/H/91/BCK	0.993	0.97	0.993	0.969	0.97	0.995	0.969	0.993	0.969	0.978	0.978	0.97	0.97	0.995
USDA	1	0.977	1	0.975	0.977	0.998	0.975	0.996	0.975	0.982	0.982	0.977	0.977	0.998
14/E/03/BBR	1	0.977	1	0.975	0.977	0.998	0.975	0.996	0.975	0.982	0.982	0.977	0.977	0.998
401/A/06/BBR	1	0.977	1	0.975	0.977	0.998	0.975	0.996	0.975	0.982	0.982	0.977	0.977	0.998
10/C/97/BR	0.977	1	0.977	0.998	1	0.975	0.998	0.973	0.998	0.959	0.959	1	1	0.975
301/K/06/BR	0.977	1	0.977	0.998	1	0.975	0.998	0.973	0.998	0.959	0.959	1	1	0.975
21/G/05/BR	0.977	1	0.977	0.998	1	0.975	0.998	0.973	0.998	0.959	0.959	1	1	0.975
13/E/03/BBR	1	0.977	1	0.975	0.977	0.998	0.975	0.996	0.975	0.982	0.982	0.977	0.977	0.998
19/F/05/BR	0.977	1	0.977	0.998	1	0.975	0.998	0.973	0.998	0.959	0.959	1	1	0.975
25/H/88/BCK	0.995	0.972	0.995	0.97	0.972	0.996	0.97	0.995	0.97	0.98	0.98	0.972	0.972	0.996
NC_006623	0.991	0.969	0.991	0.967	0.969	0.993	0.967	0.991	0.967	0.977	0.977	0.969	0.969	0.993
WangGang	0.996	0.973	0.996	0.972	0.973	0.998	0.972	0.996	0.972	0.982	0.982	0.973	0.973	0.998
LT-IVAX	1	0.977	ID	0.975	0.977	0.998	0.975	0.996	0.975	0.982	0.982	0.977	0.977	0.998
Laryngo-vac	0.975	0.998	0.975	ID	0.998	0.973	1	0.972	1	0.957	0.957	0.998	0.998	0.973
Nobilis ILT	0.977	1	0.977	0.998	ID	0.975	0.998	0.973	0.998	0.959	0.959	1	1	0.975
LTI-1	0.998	0.975	0.998	0.973	0.975	ID	0.973	0.998	0.973	0.983	0.983	0.975	0.975	1
LTI-27	0.975	0.998	0.975	1	0.998	0.973	ID	0.972	1	0.957	0.957	0.998	0.998	0.973
LTI-49	0.996	0.973	0.996	0.972	0.973	0.998	0.972	ID	0.972	0.982	0.982	0.973	0.973	0.998
LTI-50	0.975	0.998	0.975	1	0.998	0.973	1	0.972	ID	0.957	0.957	0.998	0.998	0.973
LTI-53	0.982	0.959	0.982	0.957	0.959	0.983	0.957	0.982	0.957	ID	1	0.959	0.959	0.983
LTI-54	0.982	0.959	0.982	0.957	0.959	0.983	0.957	0.982	0.957	1	ID	0.959	0.959	0.983
LTI-57	0.977	1	0.977	0.998	1	0.975	0.998	0.973	0.998	0.959	0.959	ID	1	0.975
LTI-65	0.977	1	0.977	0.998	1	0.975	0.998	0.973	0.998	0.959	0.959	1	ID	0.975
LTI-68	0.998	0.975	0.998	0.973	0.975	1	0.973	0.998	0.973	0.983	0.983	0.975	0.975	ID

Tabela 3 - Cálculo de identidade de nucleotídeos de seqüências do gene ICP4 correspondentes ao fragmento localizados entre os nucleotídeos 143017 e 143704 do VLTI

Quando analisadas as seqüências correspondentes às posições 146640 e 147275 de nucleotídeos do VLTI, as amostras isoladas durante o surto clínico mostraram 100, 99.1, 99.3 a 994 e 95.7 a 100% de identidade entre si, com a cepa TCO, as amostras CEO e amostras de outros países, respectivamente (Tabela 4). Algumas amostras detectadas após a liberação da vacina na região de Bastos foram indistinguíveis da amostra selvagem original isolada durante o surto clínico, enquanto que outras mostraram-se idênticas às cepas CEO. As amostras LTI-27, LTI-59, LTI 62 e LTI-65 mostraram serem idênticas à cepa CEO Laryngo-Vac, enquanto que a amostra LTI-57 mostrou ser idêntica à cepa CEO Novilis ILT.

Seq->	TCO	CEO	LT- IVAX	Laryngo- vac	Nobilis ILT	LTI-1	LTI- 27	LTI- 38	LTI- 39	LTI- 41	LTI- 57	LTI- 59	LTI- 62	LTI- 65
EU104908														
TCO	ID	0.989	1	0.989	0.988	0.991	0.989	0.991	0.991	0.991	0.988	0.989	0.989	0.988
EU104900														
CEO	0.989	ID	0.989	1	0.998	0.994	1	0.994	0.994	0.994	0.998	1	1	0.998
501/C/06/BR	0.989	1	0.989	1	0.998	0.994	1	0.994	0.994	0.994	0.998	1	1	0.998
402/A/06/BR	0.989	1	0.989	1	0.998	0.994	1	0.994	0.994	0.994	0.998	1	1	0.998
417/A/06/BR	0.989	0.996	0.989	0.996	0.994	0.998	0.996	0.998	0.998	0.998	0.994	0.996	0.996	0.994
24/H/91/BCK	0.991	0.994	0.991	0.994	0.993	1	0.994	1	1	1	0.993	0.994	0.994	0.993
USDA	0.998	0.988	0.998	0.988	0.986	0.989	0.988	0.989	0.989	0.989	0.986	0.988	0.988	0.986
14/E/03/BBR	1	0.989	1	0.989	0.988	0.991	0.989	0.991	0.991	0.991	0.988	0.989	0.989	0.988
EU104903														
301/K/06/BR	0.989	1	0.989	1	0.998	0.994	1	0.994	0.994	0.994	0.998	1	1	0.998
21/G/05/BR	0.989	1	0.989	1	0.998	0.994	1	0.994	0.994	0.994	0.998	1	1	0.998
EU104907														
13/E/03/BBR	1	0.989	1	0.989	0.988	0.991	0.989	0.991	0.991	0.991	0.988	0.989	0.989	0.988
19/F/05/BR	0.989	1	0.989	1	0.998	0.994	1	0.994	0.994	0.994	0.998	1	1	0.998
WangGang	0.952	0.952	0.952	0.952	0.95	0.957	0.952	0.957	0.957	0.957	0.95	0.952	0.952	0.952
HSMICP4MIE	0.983	0.983	0.983	0.983	0.981	0.988	0.983	0.988	0.988	0.988	0.981	0.983	0.983	0.981
LT-IVAX	1	0.989	ID	0.989	0.988	0.991	0.989	0.991	0.991	0.991	0.988	0.989	0.989	0.988
Laryngo-Vac	0.989	1	0.989	ID	0.998	0.994	1	0.994	0.994	0.994	0.998	1	1	0.998
Nobilis ILT	0.988	0.998	0.988	0.998	ID	0.993	0.998	0.993	0.993	0.993	1	0.998	0.998	0.996
LTI-1	0.991	0.994	0.991	0.994	0.993	ID	0.994	1	1	1	0.993	0.994	0.994	0.993
LTI-27	0.989	1	0.989	1	0.998	0.994	ID	0.994	0.994	0.994	0.998	1	1	0.998
LTI-39	0.991	0.994	0.991	0.994	0.993	1	0.994	1	ID	1	0.993	0.994	0.994	0.993
LTI-41	0.991	0.994	0.991	0.994	0.993	1	0.994	1	1	ID	0.993	0.994	0.994	0.993
LTI-57	0.988	0.998	0.988	0.998	1	0.993	0.998	0.993	0.993	0.993	ID	0.998	0.998	0.996
LTI-59	0.989	1	0.989	1	0.998	0.994	1	0.994	0.994	0.994	0.998	ID	1	0.998
LTI-62	0.989	1	0.989	1	0.998	0.994	1	0.994	0.994	0.994	0.998	1	ID	0.998
LTI-65	0.988	0.998	0.988	0.998	0.996	0.993	0.998	0.993	0.993	0.993	0.996	0.998	0.998	ID

Tabela 4 - Cálculo de identidade de nucleotídeos de seqüências do gene ICP4 correspondentes ao fragmento localizados entre os nucleotídeos 146640 e 147275 do VLTI

Foram construídas duas árvores filogenéticas com as seqüências obtidas neste estudo e no Genbank, correspondente as regiões compreendidas entre os nucleotídeos 143017 e 143704, e 146640 e 147275 do genoma viral (gene ICP4). Nas duas árvores todas as amostras isoladas durante o surto de Bastos (com exceção da amostra LTI-27) foram agrupadas em um único ramo, separadas das cepas vacinais e cepas isoladas em outros países. As amostras detectadas no Brasil após a liberação da vacina atenuada em Bastos foram congregadas em três grupos: o das amostras vacinais TCO, o das amostras vacinais CEO e o das amostras de campo isoladas durante o surto epidêmico em Bastos em 2002-2003 (Figuras 25 e 26).

Figura 25 - Arvore filogenética construída com seqüências de nucleotídeos compreendidas entre os nucleotídeos 143017 e 143704 do VLT1 (gene ICP4)

Figura 26 - Arvore filogenética construída com seqüências de nucleotídeos compreendidas entre os nucleotídeos 146640 e 147275 do VLTl (gene ICP4)

5.15 CONCORDÂNCIA ENTRE OS RESULTADOS DE PCR-RFLP E SEQÜENCIAMENTO DE DNA DO VLTÍ

As técnicas de PCR-RFLP dos produtos de quatro genes e de seqüenciamento de dois fragmentos do gene ICP4 conseguiram diferenciar as cepas atenuadas TCO e CEO da cepa de campo envolvida no surto epidêmico na região de Bastos em 2002 e 2003. As cepas CEO e TCO foram diferenciadas por digestão do produto de 4.9 kp do gene ICP4 e também mediante análise de aminoácidos de duas regiões deste gene. Ainda, a análise da região compreendida entre os nucleotídeos 143017 e 143704, permitiu discriminar entre as duas cepas CEO analisadas neste estudo. O quadro 15 mostra a caracterização das amostras isoladas de campo durante o surto epidêmico em Bastos e após a introdução das vacinas vivas atenuadas.

AMOSTRA	ANO DE DETECÇÃO	LOCAL DA DETECÇÃO	PCR RFLP	ANÁLISE DE SEQÜÊNCIAS		CLASSIFICAÇÃO CONSOLIDADA
				TK	ICP4	
LTI-1	2002	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-2	2002	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-3	2003	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-4	2003	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-6	2003	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-7	2003	Bastos	CEO	não virulenta	CEO 1	CEO 1
LTI-9	2003	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-12	2003	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-13	2003	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-15	2003	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-16	2003	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-17	2003	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-18	2003	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-19	2003	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-20	2003	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-22	2003	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1

Quadro 15 – Caracterização de amostras de campo isoladas entre os anos 2002 a 2008 por PCR-RFLP e seqüenciamento do gene ICP4 do VLTÍ

Continua...

AMOSTRA	ANO DE DETECÇÃO	LOCAL DA DETECÇÃO	PCR RFLP	ANÁLISE DE SEQÜÊNCIAS		CLASSIFICAÇÃO CONSOLIDADA
				TK	ICP4	
LTI-25	2003	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-26	2003	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-27	2003	Bastos	CEO	não virulenta	CEO 1	CEO 1
LTI-29	2004	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-32	2004	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-38	2004	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-39	2004	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-41	2004	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-44	2004	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-45	2004	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-47	2004	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-49	2004	MG	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-50	2005		CEO	não virulenta	CEO 1	CEO 1
LTI-51	2005		CEO	não virulenta	CEO 1	CEO 1
LTI-52	2005	Guatupar	CEO	não virulenta	CEO 2	CEO 2
LTI-53	2005	Guatupar	campo	virulenta	campo 2	campo 2
LTI-54	2006	Barretos	campo	virulenta	campo 2	campo 2
LTI-55	2007	Barretos	CEO	não virulenta		CEO
LTI-57	2007	Bastos	CEO	não virulenta	CEO 2	CEO 2
LTI-58	2007	Bastos	Campo	virulenta	Campo 1	campo 1
LTI-59	2007	Bastos	CEO	não virulenta	CEO 1 e 2	CEO 1 e 2
LTI-62	2007	Bastos	CEO	não virulenta	CEO 1	CEO 1
LTI-64	2007	Bastos	CEO	não virulenta	CEO 2	CEO 2
LTI-65	2007	Bastos	CEO	não virulenta	CEO 1 e 2	CEO 1 e 2
LTI-66	2007	Bastos	CEO	não virulenta	CEO 1	CEO 1
LTI-67	2007	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1
LTI-68	2007	Bastos	campo	virulenta	campo 1	campo 1

Quadro 15 – Caracterização de amostras de campo isoladas entre os anos 2002 a 2008 por PCR-RFLP e seqüenciamento do gene ICP4 do VLT1

6 DISCUSSÃO

O primeiro surto clínico da laringotraqueíte infecciosa no Brasil, que ocorreu na região de Bastos, Estado de São Paulo, apresentou características epidêmicas devido as mais de duzentas granjas acometidas e ocorreu no período compreendido entre o final de 2002 e primeiro semestre do 2003. A doença apresentou grande impacto na região, gerando mais de 1 000 000 de aves mortas como consequência das lesões severas produzidas. A epidemia afetou todas as granjas da região com diferentes intensidades, provavelmente em consequência dos variados níveis de biossegurança das empresas avícolas. Foram acometidas principalmente aves em produção e aves de recria (GAMA, 2004; CHACON et al., 2007; BUCHALA, 2008). Devido às enormes perdas econômicas produzidas, é indispensável conhecer a origem da ou das cepas envolvidas no surto.

A caracterização das amostras de campo isoladas se faz necessária para avaliar as medidas de controle implantadas pelas autoridades oficiais do setor. Estas medidas incluem a vacinação compulsória e obrigatória de todas as aves da região. A caracterização de novos casos da doença em regiões vizinhas dentro do Estado de São Paulo é de grande valia, pois permitirá comparar os isolados e determinar se o vírus causador do surto na região foi capaz de se disseminar para outras regiões geográficas. As cepas vacinais, principalmente as cepas CEO, também possuem a capacidade de se difundir para outras áreas através de fômites, entre os quais se destacam o material de cama contaminada, veículos não desinfetados e outros tipos de equipamentos contaminados (GUY; BAGUST, 2008). Os desafios e necessidades abordados até este momento nos levaram a caracterizar as amostras isoladas na região de Bastos durante e após o surto clínico, através do uso de técnicas moleculares que incluem a PCR-RFLP e seqüenciamento de DNA. Neste estudo também foram incluídas amostras coletadas de casos suspeitos da doença procedentes de outras regiões do Estado de São Paulo.

Tanto a cepa de campo como as cepas vacinais do VLTI têm a capacidade de estabelecer infecções latentes, as quais são caracterizadas por curtos períodos de eliminação viral (WILLIAMS et al., 1992b; HUGHES et al., 1989). Uma vez

latente, o vírus não é apresentado ao sistema imune por não haver expressão de suas proteínas, o que impede tanto a resposta imune por parte da ave infectada quanto à detecção de resposta imune por provas sorológicas (BAGUST; JONHSON et al., 1995; HAN; KIM, 2003).

O primeiro objetivo deste estudo foi a detecção do VLTl a partir de aves com ou sem sintomatologia da doença. Para isso, foi utilizada como técnica de triagem uma reação de *nested*-PCR (CHACON; FERREIRA, 2008), devido a sua alta sensibilidade e capacidade de detecção viral das infecções agudas e latentes. A técnica de triagem mostrou-se eficiente. O gânglio trigêmeo foi testado separadamente na tentativa de detectar o vírus em estado latente. O VLTl foi detectado principalmente a partir de “pool” de traquéia e conjuntiva (88% dos casos positivos), e também em amostras de gânglio trigêmeo e suabe traqueal (Quadro 10).

O programa de controle da doença estabelecido pelas autoridades sanitárias do Estado de São Paulo contempla o monitoramento, a detecção e a caracterização dos vírus circulantes da região para avaliar o programa estabelecido. O uso de vacinas vivas, cepas TCO e CEO, obrigaram o emprego de técnicas específicas para caracterização molecular, discriminando entre as cepas vacinais e de campo. O VLTl continuou sendo detectado (37 amostras) mesmo com a introdução das vacinas vivas na região de Bastos em fevereiro 2004. Em todos estes casos, as aves não apresentaram sintomatologia da doença. Em 10 destes casos o VLTl foi detectado no gânglio trigêmeo, o que indica persistência viral na forma latente, podendo estes vírus serem de origem vacinal ou não. Isto representa um risco, pois já foi reportado que o vírus na forma latente pode ser reativado por estresse e alterações hormonais das aves, como início da postura, entrada da ave a um lote ou muda forçada em aves de postura (HUGUES et al., 1989; WILLIAMS et al., 1992b).

Neste estudo também foram incluídas amostras de casos suspeitos da doença procedentes de granjas de poedeiras e matrizes comerciais localizadas fora da região de Bastos. Em sete destes casos o VLTl foi detectado. A caracterização molecular dos isolados foi realizada para conhecer a origem destes e saber se os vírus estariam relacionados à cepa isolada em Bastos, a alguma cepa vacinal ou trata-se de outra cepa de campo. A permanência viral neste tipo

de criação é facilitada devido ao fato do vírus propagar-se de ave infectada ou vacinada para ave susceptível (GUY; BARNES; SMITH, 1991; HUGHES et al., 1991).

Para a caracterização dos isolados de campo e das cepas vacinais utilizou-se a técnica de polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) de produtos da PCR de quatro genes: E, G, TK e ICP4. A análise do produto do gene E digerido com *DdeI* conseguiu diferenciar a cepa TCO das cepas de campo e das cepas CEO, porém as amostras isoladas de campo não puderam ser diferenciadas de uma cepa CEO (Figura 7).

Por outro lado, a análise dos produtos da PCR-RFLP dos genes G e TK mostraram resultados semelhantes, ou seja, conseguiram discriminar os isolados de campo das cepas vacinais, mas não foi possível diferenciar as cepas CEO das TCO (Figuras 9, 10, 11 e 12). Mediante esta análise, duas amostras isoladas durante o surto clínico em Bastos apresentaram o mesmo padrão de digestão que as cepas vacinais (amostras LTI-7 e LTI-27).

A digestão dos produtos de 4.9 kb do gene ICP4 apresentou maior poder discriminatório. A análise dos produtos da PCR digeridos com *MspI* e *HinfI* conseguiu diferenciar as cepas de campo das cepas vacinais. Além disso, foi possível discriminar entre as cepas CEO e TCO (Figuras 14, 15 e 16). No entanto, as amostras LTI-7 e LTI-27 não puderam ser diferenciadas das cepas vacinais CEO, semelhante ao encontrado nas análises dos genes G e TK. Trabalhos epidemiológicos realizados em outros países já reportaram a eficiência desta estratégia para discriminar as cepas vacinais dos isolados de campo (CHANG et al., 1997; GRAHAM, et al., 2000; OJICK et al., 2006; KIRKPATRICK et al., 2006; OLDONI; GARCIA, 2007; OLDONI et al., 2008). Os resultados obtidos com esta estratégia recomendam seu uso para futuros estudos.

A PCR-RFLP tem se mostrado eficiente na diferenciação dos isolados do VLTi, porém esta metodologia requer a propagação viral em um sistema biológico para permitir a amplificação simultânea de vários genes, muitos deles maiores de 2 kb (GRAHAM et al., 2000; KIRKPATRICK, 2006; OLDONI; GARCIA, 2007). Além disso, Neff, Sudler e Hoop (2008) não conseguiram discriminar entre os dois tipos de cepas vacinais por PCR-RFLP. Sem dúvida a alta homologia genética do VLTi tem dificultado sua caracterização. Adicionalmente foram relatados padrões

de restrição de isolados de campo semelhantes às cepas vacinais, porém com maior virulência do que estas (GUY; BARNES; SMITH, 1991). Portanto, são requeridos estudos de seqüenciamento dos genes relacionados com a virulência do vírus. Também é preciso determinar se há evidência de recombinação entre as cepas envolvidas em um surto, e se existe algum efeito sobre o grau de virulência da progênie recombinante (HAM; KIM, 2001b).

Estratégias envolvendo o seqüenciamento de DNA têm sido utilizadas para a diferenciação de cepas do VLTl, apresentando diferentes resultados. Ojkic et al. (2006) mostraram que a análise de seqüências de um segmento do gene G permitiu diferenciar entre os isolados de campo e as cepas vacinais, embora não tenha sido possível diferenciar entre as cepas TCO e CEO. Contudo, neste trabalho foi contemplado o uso do seqüenciamento dos genes E, TK e ICP4 para a discriminação entre cepas vacinais e de campo.

Sete amostras de campo e as três amostras vacinais incluídas neste estudo foram seqüenciadas pelo gene E. Depois da análise filogenética das seqüências obtidas, a região amplificada não permitiu diferenciar amostras de diferentes origens. Por isso, foi decidido não seqüenciar mais amostras pelo gene E (Figuras 17 e 18, e tabela 1).

Mediante o seqüenciamento do gene TK foi possível discriminar entre as cepas de campo e as cepas vacinais. A análise de aminoácidos da região seqüenciada mostrou que as cepas de campo apresentaram metionina na posição 252 do gene, enquanto que todas as cepas vacinais possuíam treonina na mesma posição (Figura 19). De acordo a classificação proposta por Han e Kim, (2001a), as cepas que apresentam metionina na posição 252 do gene, podem ser classificadas como cepas de alta virulência. As amostras de campo isoladas durante o surto epidêmico em Bastos foram agrupadas separadamente das cepas vacinais e de amostras de outros países, quando foi construída uma árvore filogenética utilizando as seqüências do gene TK (Figura 20). Esta análise mostra que o vírus da LTI causador da epidemia em Bastos, teve origem diferente dos vírus descritos e dos incluídos na análise filogenética. Sete amostras detectadas após a introdução da vacina em Bastos foram indistinguíveis das cepas CEO (Tabela 2). Estas mesmas cepas foram caracterizadas como cepas CEO pela análise de PCR-RFLP. Os resultados do seqüenciamento do gene TK, assim

como os do PCR-RFLP, confirmam que o surto de Bastos foi produzido por uma cepa não vacinal e de alta virulência.

Estudos epidemiológicos de caracterização e diferenciação das cepas circulantes e envolvidas em surtos clínicos da LTI utilizaram com êxito a metodologia que inclui a digestão do produto de 4.9 kb do gene ICP4. Seqüências de nucleotídeos do gene ICP4 publicadas no Genbank mostraram que este gene possui regiões hipervariáveis (TRIST et al., 1996). Por outro lado, os resultados da PCR-RFLP deste gene e a disponibilidade de seqüências de nucleotídeos publicados no Genbank, permitiram desenhar dois pares de *primers* e padronizar duas reações de PCR que amplificaram dois fragmentos diferentes do ICP4. A análise das seqüências de aminoácidos e nucleotídeos dos dois fragmentos amplificados permitiu diferenciar os isolados de campo das cepas vacinais. As cepas CEO e TCO também puderam ser diferenciadas entre si através da análise das seqüências de aminoácidos destes dois fragmentos (Figuras 23 e 24). As árvores filogenéticas agruparam os isolados de campo em um único grupo, separado das cepas de campo isoladas em outros países (Figura 25 e 26). A árvore filogenética agrupou a amostra LTI-27 com as cepas CEO e com isolados relacionados a esta. Nenhum isolado de campo foi agrupado com as cepas TCO. Todas as amostras de campo, isoladas durante o surto epidêmico em 2002-2003, mostraram 100% de identidade nas seqüências de nucleotídeos e aminoácidos, exceto as amostras LTI-7 e LTI-27, as quais foram indistinguíveis da cepa CEO (Laryngo-Vac) (Tabelas 3 e 4). Estas amostras também foram relacionadas às cepas CEO mediante análise de PCR-RFLP.

A estratégia envolvendo o seqüenciamento das duas regiões do gene ICP4, permitiu diferenciar os isolados de campo das cepas TCO e CEO. Além disso, a análise de nucleotídeos destes fragmentos possibilitou discriminar entre as duas cepas CEO analisadas neste estudo. Esta discriminação não tinha sido conseguida em nenhum outro estudo que utilizou as técnicas de PCR-RFLP de múltiplos genes e de seqüenciamento do gene gG (OJKIC et al., 2006). Os genes previamente seqüenciados e publicados na literatura mostraram ser altamente conservados. Este achado limitou o uso do seqüenciamento para discriminação de cepas do VLTI. A estratégia de seqüenciamento do gene ICP4 proposta neste estudo mostrou resultados idênticos com os resultados obtidos após a análise de

RFLP do produto de quatro genes. A estratégia proposta poderá ser de grande utilidade no monitoramento de regiões onde as vacinas atenuadas são utilizadas. Além disso, esta estratégia mostrou ser mais rápida que a PCR-RFLP, pois não houve necessidade de isolamento e propagação prévia em sistema biológico (KIRPATRICK, et al., 2006; OJKIC et al., 2006). Outra vantagem é possibilidade de rastrear a origem das amostras, sejam de campo ou vacinal ou de diferentes áreas geográficas.

Após confrontar e achar 100% de concordância entre os resultados da análise de RFLP dos produtos da PCR de quatro genes e do seqüenciamento dos genes TK e ICP4, o seqüenciamento do gene ICP4 foi validado e utilizado para genotipar tanto amostras detectadas em Bastos após a introdução das vacinas vivas, como as amostras isoladas de outras regiões.

Os resultados das análises de PCR-RFLP e do seqüenciamento dos genes TK e ICP4 mostraram que o surto epidêmico observado em Bastos durante 2002-2003 foi causado por um vírus não vacinal e de alta virulência, denominado neste trabalho, como cepa “Bastos”. Embora dois isolados relacionados às cepas CEO tenham sido detectados durante o surto, a cepa Bastos teve uma maior frequência de detecção (17 casos de 19 amostras caracterizadas) (Quadro 15). Em outro trabalho, Chacón et al. (2007), encontraram alta prevalência do VLTi na região de Bastos durante um surto respiratório, onde nenhum outro patógeno respiratório foi achado com frequência significativa, o que indicou a ausência de co-infecções e sugeriu que o VLTi envolvido era responsável pelo surto. Estes achados aliados aos sinais intensos e às lesões observadas indicaram que o VLTi circulante durante o surto era uma cepa de alta virulência. Esta hipótese foi confirmada mediante a classificação molecular proposta por Han e Kim (2001a).

A origem da cepa Bastos é desconhecida, uma possibilidade é que o vírus possa ter sido originado de aves não comerciais. Neff, Sudler e Hoop (2008), Oldoni et al. (2008) e Oldoni e Garcia (2007) encontraram alta prevalência do VLTi em aves não comerciais, e neste tipo de criação, a latência viral do VLTi e o tipo de criação poderiam favorecer a manutenção do vírus no meio ambiente e a disseminação para aves comerciais.

Os isolados LTI-7 e LTI-27, detectados em Bastos durante o surto mostrou ser diferente aos outros isolados. A análise de PCR-RFLP determinou este isolado

como semelhante às vacinas CEO. Inclusive, o seqüenciamento do gene ICP4, confirmou que este isolado era relacionado à cepa CEO. Provavelmente, esta vacina pode ter sido introduzida de forma ilegal durante o surto para controle da doença

Apesar do programa de vacinação compulsória adotado em Bastos, o qual inclui a vacinação do total das aves alojadas na região, a cepa “Bastos” continua circulante na região. Isto ficou em evidencia depois que 11 amostras de um total de 18 isolados caracterizados e detectados após a introdução das vacinas atenuadas foram idênticas à cepa que causou o surto inicial em 2002-2003 (cepa “Bastos”). Estes vírus foram coletados nos anos 2004, 2007 e 2008 e foram detectadas tanto de amostras de gânglio trigêmeo e “pool” de traquéia e conjuntiva ocular, enquanto os sete isolados restantes, detectados em amostras de gânglio trigêmeo e “pool” de traquéia e conjuntiva, foram caracterizados como sendo relacionados às cepas CEO (Quadro 15).

Em nenhum caso, isolados relacionados à cepa TCO foram detectados, tanto em aves vacinadas da região de Bastos, quanto em aves não vacinadas de áreas vizinhas. Este achado pode ser explicado pela baixa capacidade desta cepa de estabelecer infecções latentes e sua baixa habilidade de passar de ave vacina para ave não vacinada. Nosso achado está de acordo com outros estudos epidemiológicos publicados, os quais somente detectaram a cepa CEO em campo e envolvidos com surto clínico da doença (GRAHAM et al., 2000; KIRPATRICK et al., 2006; OJKIC et al., 2006; OLDONI; GARCIA 2007; NEFF; SUDLER; HOOP, 2008; Somente, no estudo realizado por Oldoni et al., (2008), uma cepa relacionada, porem distinguível da cepa TCO, foi detectada em uma granja próxima de outra granja que utilizava a vacina TCO.

Após a vacinação compulsória em Bastos, foram encontradas tanto as cepas vacinas CEO assim como a cepa selvagem original, causador do surto clínico em 2002-2003. A co-circulação de mais de duas cepas virais há sido bem relatada tanto em aves comerciais e não comerciais (NEFF; SUDLER; HOOP 2008; OLDONI et al., 2008). Em dois casos, as duas cepas CEO utilizadas na granja puderam ser detectadas e diferenciadas. Este achado foi confirmado pelas duas metodologias empregadas no estudo. A possibilidade de achar duas

diferentes cepas em uma ave, também foi observada e descrita por Creelan et al, (2006).

A detecção da cepa selvagem de campo em aves vacinadas com as cepas TCO e CEO evidencia a falha das vacinas em eliminar a cepa virulenta de campo. Este achado discorda com o observado por Graham et al. (2000) e Chang et al. (1997), que concluíram que as cepas vacinais, uma vez estabelecidos no campo podem eliminar a cepa de campo selvagem. No entanto, os resultados obtidos neste estudo concordam com aqueles encontrados em outros estudos, os quais mostraram a detecção de cepas de campo em aviários vacinados, tanto com as cepas vivas atenuadas como com vacinas recombinantes (OLDONI et al., 2008). Além disso, Han e Kim (2003) mostraram a incapacidade de três vacinas CEO de evitar a reinfecção com cepas de campo, embora tenham protegido as aves da doença (Quadro 15). Aparentemente as cepas vacinais conseguiram evitar o aparecimento de novos surtos, mas não foram eficientes para eliminar a cepa selvagem de campo da região afetada. Provavelmente, o agente requer condições específicas, como fatores que causam estresse nas aves, para poder originar o quadro clínico severo.

Tanto a infecção com cepas vacinais como com isolados selvagens de campo resulta em aves portadoras (HUGHES et al., 1991; WILLIAMS et al., 1992b). Neste trabalho, tanto a cepa selvagem de campo como as cepas CEO foram detectadas em amostras de gânglio trigêmeo em aves sem sintomatologia evidente. Estas aves são a principal fonte de infecção para aves não vacinadas. Elas representam um risco caso o vírus encontre as condições ideais para ser reativado e reproduzir a doença com a severidade observada no surto inicial. No caso particular da região de Bastos, a retirada da vacina representaria um grave risco, devido à permanência da cepa de campo virulenta na região e às condições de criação.

De outro lado, o vírus de campo também foi detectado em “pool” de traquéia e conjuntiva de aves vacinadas e sem sintomatologia clínica, sugerindo que o VLTi pode estar nestes tecidos de forma latente. Callison et al, (2006) já tinham sugerido que o vírus poderia-se localizar na traquéia no estado latente.

Tanto a cepa selvagem de campo, chamada neste estudo de cepa Bastos, como as cepas CEO usadas unicamente naquela região, foram detectadas fora da

região de Bastos, apartir de surtos clínicos com suspeita de doença. Este achado confirma os relatos prévios, os quais mostraram a capacidade de disseminação destas cepas para outras regiões geográficas (KEELER et al., 1993; KELLER et al., 1992; ANDREASEN; GLISSON; VILLEGAS, 1990; GUY et al., 1989). As amostras LTI-53 e LTI-54 detectadas em 2005 e 2006 respectivamente, apartir de aves com doença respiratória procedentes de granjas localizadas fora da região de Bastos não puderam ser diferenciadas da cepa “Bastos” por análise de PCR-RFLP. A análise de aminoácidos destes isolados mostrou pequenas diferencias com o vírus causador do surto em Bastos. Estes isolados podem ser originados da cepa Bastos e as diferencias podem ser explicadas por processos de adaptação viral. Contudo, para demonstrar esta relação, é necessária a caracterização de novos isolados procedentes da mesma região e análise de outros genes.

As técnicas de PCR-RFLP e de análise de seqüências do gene ICP4, desenvolvido neste estudo, conseguiram discriminar as cepas TCO, CEO e as cepas selvagens de campo. Além disso, a estratégia desenvolvida neste estudo permitiu diferenciar entre as duas cepas CEO utilizadas no estudo.

As técnicas utilizadas para caracterização de isolados de campo mostraram que o surto clínico em 2002-2003 foi causado por uma cepa não vacinal e de alta virulência. Esta cepa de campo continua circulando na região de Bastos apesar do programa de vacinação compulsória. Além do que, tanto cepas vacinais CEO quanto os isolados relacionados à cepa Bastos foram detectados em casos clínicos de LTI em granjas localizadas fora da região de Bastos, o que indica a disseminação destas cepas para outras regiões geográficas.

7 CONCLUSÕES

- O surto epidêmico observado na região de Bastos entre os anos 2002 e 2003 foi causado por um vírus não vacinal e de alta virulência.
- Durante o surto respiratório em Bastos também foram detectados dois isolados relacionados à cepa CEO.
- As técnicas de RFLP-PCR e análise de seqüências do gene ICP4, usadas para a diferenciação entre isolados de campo e cepas vacinais TCO e CEO mostraram resultados idênticos.
- A estratégia de seqüenciamento de duas regiões do gene ICP4 desenvolvida neste estudo mostrou-se eficiente, pratica e rápida quando comparada com a análise de RFLP-PCR.
- A cepa de campo causadora do surto epidêmico em Bastos continua circulando na região, apesar do uso das vacinas vivas atenuadas.
- Isolados de campo relacionados às cepas vacinais CEO, utilizadas na região de Bastos, foram detectados em casos clínicos da doença em granjas localizadas fora da região de Bastos.
- Isolados de campo relacionados à cepa causadora do surto na região de Bastos também foram isolados de surtos de LTI em granjas localizadas fora da região de Bastos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, F.; ANDREASEN, J. R. Comparison of diagnostic test for Infectious Laryngotracheitis. **Avian Diseases**, v. 40, n. 2, p. 290-295, 1996.
- ABBAS, F.; ANDREASEN, J. R.; JACKWOOD, M. W. Development of a Polymerase chain reaction and a nonradioactive DNA probe for Infectious Laryngotracheitis Virus. **Avian Diseases**, v. 40, n. 1, p. 56-62, 1996.
- ALEXANDER, H. S.; KEY, D. W.; NAGY, E. Analysis of Infectious Laryngotracheitis Virus isolates from Ontario and New Brunswick by the Polymerase chain reaction. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 62, n. 1, p. 68-71, 1998.
- ALEXANDER, H. S.; NAGY, E. Polymerase chain reaction to detect Infectious Laryngotracheitis Virus in conjunctival swabs from experimentally infected chickens. **Avian Diseases**, v. 41, n. 3, p. 646-653, 1997.
- ANDREASEN, J. R.; GLISSON, J. R.; VILLEGAS, P. Differentiation of vaccine strains and Georgia Field Isolates of infectious Laryngotracheitis Virus by their Restriction endonuclease fragment patterns. **Avian Diseases**, v. 34, p. 646-656, 1990.
- BABIC, N.; KLUPP, B.; BRACK, A.; METTENLEITER, T. C.; UGOLINI, G.; FLAMAND, A. Deletion of glycoprotein gE reduces the propagation of Pseudorabies virus in the nervous system of mice after intranasal inoculation. **Virology**, v. 219, p. 279-284, 1996.
- BAGUST, T. J. Laryngotracheitis (Gallid-1) Herpesvirus Infection in the chicken. 4. Latency establishment by wild and vaccine strains of ILT virus. **Avian Pathology**, v. 15, p. 581-595, 1986.
- BAGUST, T. J.; CALNEK, B.; WFAHEY, K. J. Gallid-1 Herpesvirus Infection in the chicken. 3. Reinvestigation of the pathogenesis of Infectious Laryngotracheitis in acute and early post-acute respiratory disease. **Avian Diseases**, v. 30, p. 179-190, 1986.
- BAGUST, T. J.; JOHNSON, M. A. Avian infectious laryngotracheitis: virus-host interactions in relation to prospects for eradication. **Avian Pathology**, v. 24, p. 373-391, 1995.

BAUER, B.; LOHR, J. E.; KALETA, E. F. Comparison of commercial ELISA test kits from Australia and the USA with the serum neutralization test in cell cultures for the detection of antibodies to the Infectious Laryngotracheitis Virus of chickens. **Avian Pathology**, v. 28, n. 1, p. 65-72, 1999.

BAUTISTA, D. Isolation of Infectious laryngotracheitis virus (ILTV) from peafowls and chickens with a history of respiratory diseases. In: AVMA ANNUAL CONVENTION, 140. 2003, Colorado. Convention notes... Colorado: **American Association of Avian Pathologists**, 2003. p. 24.

BRAUNDT, C. R.; GRAU, D. R. Mixed infection with herpes simplex virus type I generates recombinants with increased ocular and neurovirulence. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 31, p. 2214-2223, 1990.

BUCHALA, F. Laringotraqueíte infecciosa das aves: caso brasileiro. In: Conferência Apinco 2004 de ciência e tecnologia, 2004, [Anais Congresso Apinco de ciência e tecnologias avícolas]. p. 93-113.

BUCHALA, F. **Planejamento, implantação e administração de medidas de defesa sanitária animal para o controle da laringotraqueíte infecciosa aviária, de 2002 a 2006, na região de Bastos, Estado de São Paulo, Brasil**. 2008. 157f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de ciências agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

CALLISON, S. A.; JACKWOOD, M. W.; HILT, D. A. Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates foreign to the United States and comparison with United States isolates. **Avian Diseases**, v. 45, n. 2, p. 492-499, 2001.

CALLISON, S.A.; RIBLET, S.M.; OLDONI, I.; SUN, S.; ZAVALA, G.; WILLIAMS, S.; RESURRECCION, R.S.; SPACKMAN, E.; GARCIA, M. Development and validation of a real-time Taqman® assay for the detection and quantitation of infectious laryngotracheitis virus in poultry. **Journal Virological Methods** v. 139, p. 31–38. 2007.

CHACÓN, J. L.; BRANDÃO, P.; VILLARREAL, L.; GAMA, N.; FERREIRA, A.J.P. Survey of Infectious laryngotracheitis outbreak in chicken layer hens and differential diagnosis with other respiratory pathogens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 9, p. 61-67, 2007.

CHACÓN, J. L.; FERREIRA, A. J. P. Development and validation of nested-PCR for the diagnosis of clinical infectious laryngotracheitis. **Journal Virological Methods**, v. 151, p. 188-193, 2008.

CHANG, P. C.; LEE, Y. L.; SHIEN, J. H.; SHIEH, H. K. Rapid differentiation of vaccine strains and field isolates of Infectious Laryngotracheitis Virus by restriction fragment length polymorphism of PCR products. **Journal Virological Methods**, v. 66, p. 179–186, 1997.

CHOMKSINSKY, P. A. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and protein from the cell and tissues samples. **Biotechniques**, v. 15, p. 532-537, 1993.

CLAVIJO, A.; NAGY, É. Differentiation of infectious Laryngotracheitis Virus strains by Polymerase chain reaction. **Avian Diseases**, v. 41, p. 241–246, 1997.

COEN, D. M.; KOSZ-VNENCHAK, M.; JACOBSON, J. G.; LEIB, D. A.; BOGARD, C. L.; CHAFFER, P. A.; TAYLOR, K. L.; KNIPE, D. M. Thymidine-kinase-negative herpes simplex virus mutants establish latency in mouse trigeminal ganglia but do not reactivate. **Proceeding National Academy of Science**, v. 86, p. 4736-4740, 1989.

COVER, M. S. The early history of Infectious Laryngotracheitis. **Avian Diseases**, v. 40, n. 3, p. 494-500, 1996.

CREELAN, J. L.; CALVERT, V. M.; GRAHAM, D. A.; MCCULLOUGH, S.J. Rapid detection and characterization from field cases of infectious laryngotracheitis virus by real-time polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Avian Pathology**, v. 35, p. 173-179, 2006.

DEVLIN J. M.; BROWNING, G. F.; HARTLEY, C. A.; KIRKPATRICK, N. C.; MAHMOUDIAN, A.; NOORMOHAMMADI A. H.; GILKERSON, J. R. Glycoprotein G is a virulence factor in infectious laryngotracheitis virus. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 2839–2847, 2006.

EFSTHIOU, S.; KEMP, S.; DRABY, G.; MINSON A. C. The role of herpesvirus simplex virus type 1 thymidine kinase in pathogenesis. **Journal of General Virology**, v. 70, p. 869-979, 1989.

FERRARI, M.; METTENLEITER, T. C.; ROMANELLI, M. G.; CABASSI, E.; CORRADI, A.; DALMAS, N.; SILINI, R. A comparative study of Pseudorabies virus (PRV) strains with defects in thymidine kinase and glycoprotein genes. **Journal Comparative Pathology**, v. 123, p. 152–163, 2000.

FUCHS, W.; ZIEMANN, K.; TEIFKE, J. P.; WERNER, O.; METTENLEITER, T. The non-essential UL50 gene of avian infectious laryngotracheitis virus encodes a functional dUTPase which is not a virulence factor. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 3, p. 627–638, 2000.

FUJITA, K.; MAEDA, K.; YOKOYAMA, N.; MIYAZAWA, T.; KAI, C.; MIKAMI, T. In vitro recombination of feline herpesvirus type 1. **Archives of Virology**, v. 143, p. 25–34, 1998.

GAMA, N. M. S. Laringotraqueíte: o caso brasileiro. In: Conferencia Apinco 2004 de ciência e tecnologia, 2004, **[Anais de Conferencia Apinco de ciência e tecnologias avícolas]**. p. 85–92.

GARCIA, M.; RIBLET, S. M. Characterization of Infectious Laryngotracheitis Virus isolates: demonstration of viral subpopulations within vaccine preparations. **Avian Diseases**, v. 45, p. 558–566, 2001.

GLAZENBURG, K. L.; MOORMANN, R. J. M.; KIMMAN, T. G.; GIELKENS, A. L. J.; PEETERS, B. P. H. Genetic recombination of pseudorabies virus: evidence that homologous recombination between insert sequence is less frequent than between autologous sequence. **Archives of Virology**, v. 140, p. 671–685, 1995.

GRAHAM, D. A.; McLAREN, I. E.; CALVERT, V.; TORRENS D.; MEEHAN, B. M. RFLP analysis of recent Northern Ireland isolates of infectious laryngotracheitis virus: comparison with vaccine virus and field isolates from England, Scotland and the Republic of Ireland. **Avian Pathology**, v. 29, p. 57–62, 2000.

GRIFFIN, A. M. Identification of 21 genes of infectious laryngotracheitis virus using random sequencing of genomic DNA. **Journal General Virology**, v. 70, n. 11, p. 3085–3089, 1989.

GUY, J. S.; BAGUST, T. J. **Laryngotracheitis**. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; MCDOUGALD L. R.; SWAYNE, D. E. Disease of Poultry. 12th. ed. Ames: Iowa State University, Press, 2008. p. 121–134.

GUY, J. S.; BARNES, H. J.; MUNGER, L. L.; ROSE, L. Restriction endonuclease analysis of Infectious Laryngotracheitis Viruses: comparison of modified – live vaccine viruses and North Carolina field isolates. **Avian Diseases**, v. 33, p. 316–323, 1989.

GUY, J. S.; BARNES, H. J.; SMITH, L. Increased virulence of modified – live Infectious Laryngotracheitis vaccine Virus following bird – to- bird passage. **Avian Diseases**, v. 35, p. 348–355, 1991.

HAN, M. G.; KIM, S. J. Analysis of Korean strains on Infectious Laryngotracheitis Virus by nucleotide sequences and restriction fragment length polymorphism. **Veterinary Microbiology**, v. 83, p. 321–331, 2001a.

HAN, M. G.; KIM, S. J. Comparison of virulence and restriction endonuclease cleavage patterns of infectious Laryngotracheitis viruses isolated in Korea. **Avian pathology**, v. 30, p. 337–344, 2001b.

HAN, M. G.; KIM, S. J. Efficacy of live virus vaccines against Infectious Laryngotracheitis assessed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Avian Diseases**, v. 47, p. 261–271, 2003.

HAYASHI, S.; ODAGIRI, Y.; KOTANI, T.; HORIUCHI, T. Pathological changes of tracheal mucosa in chickens infected with infectious laryngotracheitis virus. **Avian Diseases**, v. 29, n. 4, p. 943-950, 1985.

HIDALGO, H. Infectious Laryngotracheitis: a review. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 5, n. 3, p. 157-168, 2003.

HUGHES, C. S.; GASKELL, R. M.; JONES, R. C.; BRADBURY, J. M.; JORDAN, F. T. W. Effects of certain stress factors on the re-excretion of infectious laryngotracheitis virus from latently infected carrier birds. Research in **Veterinary Science**, v. 46, p. 274-276, 1989.

HUGHES, C. S.; JONES, R. C. Comparison of cultural methods for primary isolation of infectious laryngotracheitis virus from field material. **Avian Pathology**, v. 17, p. 295–303, 1988.

HUGHES, C. S.; JONES, R. C.; GASKELL, R. M.; JORDAN, F. T. W.; BRADBURY, J. M. Demonstration in live chickens of the carrier state in infectious laryngotracheitis. Research in **Veterinary Science**, v. 42, p. 407-410, 1987.

HUGHES, C. S.; WILLIAMS, R. A.; GASKELL, R. M.; JORDAN, F. T.; BRANDBURY, J. M.; BENNETT, M.; JONES, R. C. Latency and reactivation of infectious laryngotracheitis vaccine virus. **Archives of Virology**, v. 121, p. 213-218, 1991.

HUMBERD, J.; GARCÍA, M.; RIBLER, S. M.; RESURRECCIÓN, R. S.; BROWN, T. P. Detection of Infectious Laryngotracheitis Virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by Nested polymerase chain reaction. **Avian Diseases**, v. 46, p. 64-74, 2002.

IZUCHI, T.; HASEGAWA, A. Pathogenicity of Infectious Laryngotracheitis Virus as measured by chicken embryo inoculation. **Avian Diseases**, v. 26, p. 18-25, 1982.

JAVIER, R. T.; SEDARANI, F.; STEVENS, J. G. Two virulent herpes simplex viruses generate lethal recombinants in vivo. **Science**, v. 234, p. 746-749, 1986.

JOHNSON, M. A.; PRIDEAUX, C. T.; KONGSUWAN, K.; SHEPPARD, M.; FAHEY, K. J. Gallid herpesvirus 1 (infectious laryngotracheitis virus): cloning and physical maps of the SA-2 strain. **Archives of Virology**, v. 119, p. 181-198, 1991.

JOHNSON, M. A.; TYACK, S. G.; PRIDEAUX, C.; KONGSUWAN, K.; SHEPPARD, M. Nucleotide sequence of infectious laryngotracheitis virus (gallid herpesvirus) ICP4 gene. **Virus Research**, v. 35, p. 193-204, 1995.

KELLER, C. L.; BENSON, C. E.; DAVISON, S.; ECKROADE, R. J. Differences among restriction endonuclease DNA finger of Pennsylvania field isolates, vaccines strains and challenge strains of Infectious Laryngotracheitis Virus. **Avian Diseases**, v. 36, p. 575-581, 1992.

KEELER, C. L.; HAZEL, J. W.; HASTING, J. E.; ROSENBERGER, J. K. Restriction endonuclease analysis of Delmarva field isolates of Infectious Laryngotracheitis Virus. **Avian Diseases**, v. 37, p. 418-426, 1993.

KEELER, C. L.; KINGSLEY, D. H.; ADAMS, C. R. Identification of the thymidine kinase gene of Infectious Laryngotracheitis Virus. **Avian Diseases**, v. 35, p. 920-929, 1991.

KINTNER, R. L.; ALLAN, R. W.; BRANDT, C. R. Recombinants are isolated at high frequency following in vivo mixed ocular infection with two avirulent herpes simplex virus type 1 strains. **Archives of Virology**, v. 140, p. 231-244, 1995.

KIRKPATRICK, N.; MAHMOUDIAN, A.; O'ROURKE, D.; NOORMOHAMMADI, A. Differentiation of Infectious Laryngotracheitis Virus Isolates by Restriction Fragment Length Polymorphic Analysis of Polymerase Chain Reaction Products Amplified from Multiple Genes. **Avian Diseases**, v. 50, n. 1, p. 28-34, 2006.

KOTIW, M.; WILKS, C. R.; MAY, J. T. The effect of serial in vivo passage on the expression of virulence and DNA stability of an infectious laryngotracheitis virus strain of low virulence. **Veterinary microbiology**, v. 45, p. 71-80, 1995.

KONGSUWAN, K.; JOHNSON, M. A.; PRIDEAUX, C. T.; SHEPPARD, M. Identification of an infectious laryngotracheitis virus gene encoding an immunogenic protein with a predicted Mr of 32 kilodaltons. **Virus Research** v. 29, p. 125-140, 1993.

KRUGER, J. M.; SUSSMAN, M. D.; MAES, R. K. Glycoproteins gL and gE of Feline herpesvirus-1 are virulence genes: safety and efficacy of a gL-gE deletion mutant in the natural host. **Virology**, v. 220, p. 299-308, 1996.

KUMAR, S.; TAMURA, I. T.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M. MEGA 2: Molecular evolutionary Analysis software. **Bioinformatics**, v.17, n. 12, p. 1244-1249, 2001.

LEIB, D. A.; BRADBURY, J. M.; GASKELL, R. M.; HUGHES, C. S.; JONES R. C. Restriction endonuclease patterns of some European and American isolates of Avian Infectious Laryngotracheitis Virus. **Avian Diseases**, v. 30, p. 835-837, 1986.

LINARES, J. A.; BICKFORD, A. A.; COOPER, G. L.; CHARLTON B. R.; WOOLCOCK, P. R. An outbreak of Infectious Laryngotracheitis in California broilers. **Avian Diseases**, v. 38, n. 1, p. 188-192, 1994.

METTENLEITER, T. C. Molecular biology of Pseudorabies (Aujeszky's disease) virus. **Comparative Immunological microbiological infectious diseases**, v. 14, p. 151-163, 1991.

METTENLEITER, T. C. Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. **Virus Research**, v. 92, p. 197-206, 2003.

MIYAKI, C. Y.; RUSSO, C. M.; PEREIRA, S. L. Reconstrução filogenética. Introdução e o método da máxima parcimônia. In: MATIOLI, S. R. **Biologia molecular e evolução**. SP: Holos Editora, 2001. p. 97 – 107.

NEFF, C.; SUDLER, C.; HOOP, R. K. Characterization of Western European field isolates and vaccine strains of avian infectious laryngotracheitis virus by restriction fragment length polymorphism and sequence analysis. **Avian Diseases**, v. 52, p. 278-283, 2008.

NUNBERG, J. H.; WRIGHT, D. K.; COLE, G. E.; PETROVSKIS, E. A.; POST L. E.; COMPTON T.; GILBERT, J. H. Identification of the thymidine kinase gene of feline herpesvirus: use of degenerate oligonucleotides in the polymerase chain reaction to isolate herpesvirus gene homologues. **Journal of Virology**, v. 63, p. 3240-3249, 1989.

OJKIC, D.; SWINTON, J.; VALLIERES, M.; MARTIN, E.; SHAPIRO, J.; SANEI, B.; BINNINGTON, B. Characterization of field isolates of Infectious laryngotracheitis from Ontario. **Avian pathology**, v. 35, n. 4, p. 286-292. 2006.

OLDONI, I.; GARCIA, M. Characterization of infectious laryngotracheitis virus isolates from the United States by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of multiple genome regions. **Avian Pathology**, v. 36, n. 2, p. 167-176, 2007.

OLDONI I.; RODRIGUEZ-AVILA, A.; RIBLET, S.; GARCIA, M. Characterization of infectious laryngotracheitis virus (ILT) isolates from commercial poultry by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Avian Diseases**, v. 52, p. 59-63, 2008.

PORTZ, C.; BELTRAÕ, N.; QUEDI, T.; BIANCO, A.; MACAGNAN, M.; GRIEBELER, J.; ROSA, C.; COLODEL, E.; DRIEMEIER, D.; BACK, A.; SCHATZMAYR, O.; CANAL, C. Natural infection of turkeys by infectious laryngotracheitis virus. **Veterinary Microbiology**. v. 131, n. 1-2, p. 57-64, 2008.

ROIZMAN, B. **Herpesviridae** In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. Fundamental Virology, 3 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996.

ROIZMAN, B. The family Herpesviridae: general description, taxonomy and classification. In: ROIZMAN, B. **The herpesviruses**, v. 1, New York: Plenum Press, 1982. V. 1, p. 1-23.

ROIZMAN, B.; SEARS, A. E. **Herpes simplex viruses and their replication**. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. Fundamental virology, 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996.

RUANO, M.; EL-ATTRACHE, J.; VILLEGAS, P. Efficacy comparisons of disinfectants used by the commercial poultry industry. **Avian Diseases**, v. 45, n. 1, p. 972-977, 2001.

SAGESSE, C. Bastos vence os desafio na produção de ovos. **Ave World**, v. 3, n. 16, p. 4-8, 2005.

SANDER, J. E.; THAYER, S. G. Evaluation of ELISA titers to Infectious Laryngotracheitis. **Avian Diseases**, v. 41, n. 2, p. 426-432, 1997.

SCHNITZLEIN, W. M.; RADZEVICIUS, J.; TRIPATHY, D. N. Propagation of Infectious Laryngotracheitis Virus in an Avian liver cell line. **Avian Diseases**, v. 38, n. 2, p. 211-217, 1994.

SCOTT, S. D.; ROSS, N. L. J.; BINNS, M. M. Nucleotide and predicted amino acid sequences of the Marek's disease virus and turkey herpesvirus thymidine kinase genes, comparison with thymidine kinase genes of other herpesviruses. **Journal of General Virology**, v. 70, p. 3055-3065, 1989.

SELLERS, H.; GARCIA, M.; GLISSON, J.; BROWN, T.; SANDER, J.; GUY, J. Mild infectious Laryngotracheitis in broilers in Southeast. **Avian Diseases**, v. 48, p. 430-436, 2004.

SMIETANKA, K. Re-emergence of Infectious laryngotracheitis in Poland. In: AVMA ANNUAL CONVENTION, 140., 2003, Colorado. **Convention notes... Colorado**: American Association of Avian Pathologists, 2003. p. 31.

SPEAR, P. G. Glycoproteins specified by herpes simplex virus. In: ROIZMAN, D. **The herpesviruses**. New York: Plenum, 1984.

TIMURKAAN, N.; YILMAZ, F.; BULUT, H.; OZER, H.; BOLAT, Y. Pathological and immunohistochemical findings in broilers inoculated with a low virulent strain of Infectious Laryngotracheitis Virus. **Journal Veterinary Science**, v. 4, n. 2, p. 175-180, 2003.

TRIST, H. M.; TYACK, S. G.; JOHNSON, M. A.; PRIDEAUX, C. T.; SHEPPARD, M. Comparison of the genomic short regions of a vaccine strain (SA-2) and a virulent strain (CSW-1) of infectious laryngotracheitis virus (gallid herpesvirus 1). **Avian Diseases**, v. 40, p. 130-139, 1996

VILLARREAL, L. Y. B.; BRANDÃO, P. E.; CHACÓN, J. L. V.; DORETTO, L.; GAMA, N. S.; ISHIZUKA, M. M.; LUCHESE, A.; BUCHALA, F.; FERREIRA, C. S. A.; FERREIRA, A. J. P. Detection and molecular characterization of infectious laryngotracheitis virus in laying hens in Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 6, n. 4, p. 253-256, 2004.

WHETSTONE, C. A.; WHEELER, J. G.; REED, D. E. Investigation of possible vaccine-induced epizootics of infectious bavian rhinotracheitis, using restriction endonuclease analysis of viral DNA. **American Journal Veterinary Research**, v. 47, n. 8, p. 1789-1795, 1986.

WILD, M. A.; COOK, S.; COCHRAN, M. A genomic map of infectious laryngotracheitis virus and the sequence and organization of the gene present in the unique short and flanking regions. **Virus Genes**, v. 12, p. 107-116, 1996.

WILLIAMS, R. A.; AL-AFALEQ, A. I.; JORDAN, F. T. W.; BRADBURY, J. M.; GASKELL, R. M.; BENNETT, M.; JONES, R. C. Pathogenicity of latent Infectious Laryngotracheitis Virus in chickens. **Avian Pathology**, v. 21, p. 287-294, 1992a.

WILLIAMS, R. A.; BENNET, M.; BRADBURY, J. M.; GASKELL, R. M.; JONES, R. C.; JORDAN, F. T. W. Demonstration of sites of latency of infectious laryngotracheitis virus using the polymerase chain reaction. **Journal General Virology**, v. 73, p. 2415-2430, 1992b.

YORK, J. J.; FAHEY, K. J. Humoral and cell-mediated immune responses to the glycoproteins of infectious laryngotracheitis herpesvirus. **Archives of Virology**, v. 115, n. 3-4, p. 289-297, 1990.